

Entwicklung kolloidaler Arzneistoffträgersysteme zur Stabilisierung von Hyperforin

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Dipl.-Ing. Thomas Kellner
aus Northeim

1. Referentin:

Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

2. Referent:

Prof. Dr. Dr. Reinhard H. H. Neubert

eingereicht am:

06. Januar 2020

mündliche Prüfung (Disputation) am:

27. Februar 2020

Druckjahr: 2020

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

Publikationen

J. Füller, T. Kellner¹, M. Gaid, L. Beerhues, C.C. Müller-Goymann, Stabilization of hyperforin dicyclohexylammonium salt with dissolved albumin and albumin nanoparticles for studying hyperforin effects on 2D cultivation of keratinocytes in vitro, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Volume 126, May 2018, Pages 115-122

J. Füller, N. Beißner, A. B. Albero, T. Kellner, L. Lauterboeck, J. Liang, M. Böhl, B. Glas-macher, S. Reichl, C.C. Müller-Goymann, Improved in vitro models for preclinical drug and formulation screening focusing on 2D and 3D skin and cornea constructs (review), European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Volume 126, May 2018, Pages 57-66

¹ geteilte Erstautorenschaft: J. Füller und T. Kellner

Tagungsbeiträge

T. Kellner, M. Gaid, L. Beerhues, C.C. Müller-Goymann, Hyperforin Loading of Albumin (BSA) Nanoparticles (poster), 1th SPhERe, Braunschweig/Germany, 18 - 20 October (2015)

T. Kellner, C.C. Müller-Goymann, Hyperforin loading of albumin (BSA) nanoparticles (poster), 10th PBP World Meeting, Glasgow/UK, 04 - 07 April (2016)

T. Kellner, K. Baumann, C.C. Müller-Goymann, Optimized production of solid lipid nanoparticles in microsystems (poster), DPhG Annual Meeting, Saarbrücken/Germany, 26 - 29 September (2017)

T. Kellner, C.C. Müller-Goymann, Hyperforin stabilization by solid lipid nanoparticles processed in microsystems (poster), 11th PBP World Meeting, Granada/Spain, 19 - 22 March (2018)

T. Kellner, C.C. Müller-Goymann, Hyperforin stabilization by nanoemulsions processed in microsystems (poster), DPhG Annual Meeting, Hamburg/Germany, 02 - 05 October (2018)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carola-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei der Bearbeitung sowie der ständigen und spontanen Bereitschaft zur Diskussion. Die zahlreichen persönlichen Gespräche haben mir viel bedeutet.

Herrn Prof. Dr. Dr. Reinhard H. H. Neubert vom Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens. Frau Prof. Dr. Heike Bunjes und Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig danke ich für die Wahrnehmung der Aufgaben in der Promotionskommission.

Ich danke allen, die mich im Laufe meiner Dissertation unterstützt und somit einen wesentlichen Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit geleistet haben. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Till Beuerle vom Institut für Pharmazeutische Biologie für die Durchführung der ESI-MS-Analysen, Dr. Michael Martens vom Institut für Elektrische Messtechnik und Grundlagen der Elektrotechnik für die Erstellung der Rasterelektronenmikroskop-aufnahmen von unbeladenen Albumin-Nanopartikeln und Dr. Mathias Müsken vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung für die Erstellung der TEM-Aufnahmen der lipidhaltigen Nanopartikel.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter des Instituts für Pharmazeutische Technologie. Speziell danke ich Frau Lucia Albrecht für die Durchführung der Zellkulturexperimente bei den NE-Formulierungen, Frau Ursula Jahn für die Dichte und

Viskositätsmessungen meiner Formulierungen und Frau Manuela Handt für die DSC-Messungen zur Schmelzpunktbestimmung des Lecithins. Frau Kirsten Nebelung (alias Napi) danke ich für die Erstellung der Gefrierbruchpräparate und den regen Gedankenaustausch. Frau Carmen Gröchtmeier danke ich für die stets gute Unterstützung im Laboralltag und die vielen Diskussionsgespräche. Herrn Sven Pape danke ich sehr für seine Hilfsbereitschaft und die schnelle sowie kompetente Lösung von Problemen elektronischer Natur.

Herrn Jendrik Füller danke ich für die gute Kooperation während des SynFoBiA - Verbundprojektes „Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika“. Herrn Dr. Sasha Pretor danke ich für die Einweisung in den Umgang mit der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage. Frau Dr. Panita Suwannoi vom Department of Manufacturing Pharmacy der Mahidol Universität in Bangkok danke ich für die Instruktionen zur Herstellung von Albumin-Nanopartikeln. Herrn Stephan Schönfeld und Herrn Dr. Andreas Lauterbach danke ich für die gute Unterstützung während meines Promotionsstarts.

Frau Verena Ledwig sowie Frau Dr. Sandra Gehrman danke ich für die Ablenkungen vom Unialltag (Segeln). Frau Juliane Riewe danke ich für die vielen kleinen Anekdoten, die während unserer Promotionszeit entstanden sind. Ein großer Dank geht auch an Herrn Christoph Brammann für den regen Ideenaustausch, der zu interessanten Projekten führte (BabyBeard).

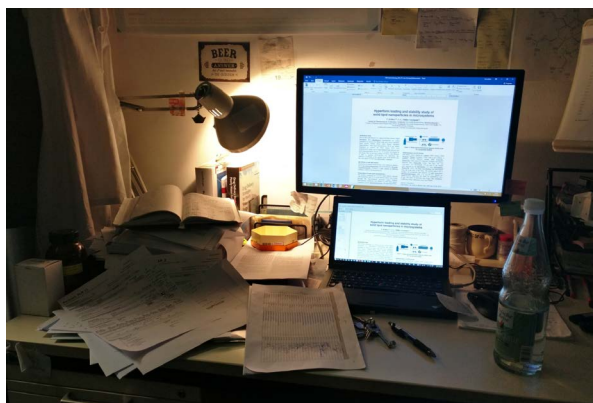
Herrn Julius Sundermann danke ich für die dauerhafte Bereitschaft mit mir gemeinsam Experimente bis spät in die Abendstunden durchzuführen und die erleuchtenden Gespräche während der Mittagspausen. Unsere regelmäßigen Diskussionsrunden zusammen mit Frau Elin Roese und Frau Meike Hasenzahl unter dem Motto siRNA werden mir immer gut in Erinnerung bleiben.

Dem Niedersächsische Ministerium für Wissenschaft und Kultur danke ich für die finanzielle Unterstützung während des SynFoBiA - Verbundprojektes.

Frau Sarah Barthelmann und Frau Rebecca Wiesner danke ich sehr für ihre Revision und Meinungen zur ersten Version dieser Arbeit. Schlussendlich danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, die mich in allem unterstützen und mir immer zur Seite stehen.

„I think there are probably too many smart people pursuing Internet stuff, finance, and law. That is part of the reason why we haven't seen as much innovation.“

(Elon Reeve Musk)



Abkürzungsverzeichnis

Sofern nicht anders angegeben, bestehen alle Einheiten aus den sieben SI-Basiseinheiten bzw. sind aus diesen zusammengesetzt. Gegebenenfalls sind ihnen Dezimal-Präfixe, nach der SI-Definition auch SI-Präfixe, vorangestellt. Aus diesem Grund werden diese Abkürzungen bzw. Symbole nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

ANP	Albumin-Nanopartikel
ÄP	Äußere Phase
API	engl. Active Pharmaceutical Ingredient, dt. Wirkstoff im Arzneimittel, dem die arzneiliche Wirkung zugeschrieben wird
AUC	engl. area under the curve, dt. Fläche unter der Kurve, entspricht mathematisch dem bestimmten Integral
BCS	engl. Biopharmaceutics Classification System, dt. Biopharmazeutische Klassifizierungssystem
BSA	Bovines Serumalbumin
cps	Counts per second, dt. Zählimpulse pro Sekunde
d	Tage
Da	Dalton (Einheit der Molekülmasse), 1 Da = 1 u
DLS	Dynamische Lichtstreuung
d.h.	das heißt
DoE	engl. Design of Experiments, dt. Statistische Versuchsplanung
DSC	engl. Differential Scanning Calorimetry, dt. Dynamische Differenzkalorimetrie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

Abkürzungsverzeichnis

DMSO	Dimethylsulfoxid
dt.	deutsch
engl.	englisch
et al.	et alii (Maskulinum), dt. und andere
EtOH	Ethanol
FCS	engl. fetal calf serum, dt. Fetales Kälberserum
GIMP	GNU Image Manipulation Program
HaCaT	engl. <i>Human adult skin keratinocytes propagated under low Ca^{2+} conditions and elevated temperature</i> [1], dt. menschliche Hautkeratinozyten unter niedrigen Ca^{2+} -Bedingungen und erhöhter Temperatur
h	Stunden
HPLC	engl. high performance liquid chromatography, dt. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSA	engl. Human serum albumin, dt. Humanalbumin
HYP	Hyperforin
HYP-DCHA	Hyperforin-Dicyclohexylammonium-Salz
LD	Laserdiffraktometrie
LD ₅₀	engl. Lethal Dose 50 %, dt. Letale Dosis, pro Körpergewicht, bei der 50 % der Testpopulation stirbt
lsg	Lösung
LOD	engl. Limit of detection, dt. Nachweisgrenze
LOQ	engl. Limit of quantification, dt. Bestimmungsgrenze
MCT	engl. Medium-Chain triglycerides, dt. Mittelkettige Triglyceride
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	engl. molecular weight, dt. Molekülmasse
MWCO	Molecular Weight Cut Off (die minimale Molekülmasse globulärer Moleküle, welche durch die Membran zu 90 % zurückgehalten werden, Einheit: Dalton)
N/A	engl. not available, dt. nicht vorhanden

NE	Nanoemulsion
NTA	Nanopartikel-Tracking-Analyse
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry, veröffentlicht verbindliche Empfehlungen unter anderem zu Nomenklatur, Symbolen, Terminologie und standardisierten Messmethoden
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline, dt. Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
p.d.u.	engl. procedure defined unit, dt. prozessbedingte Einheit, früher arbitrary unit, dt. willkürliche Einheit; nach UPAC [2]
PEG	Polyethyleneglycol
Ph. Eur.	lat. Pharmacopoea Europaea, dt. Europäische Arzneibuch
S/N	signal to noise, dt. Signal-Rausch-Verhältnis
SD	engl. standard deviation, dt. Standardabweichung (hier immer empirische Standardabweichung)
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate, dt. Natriumdodecylsulfat/ Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, dt. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SI	franz. Système international d'unités, dt. Internationales Einheitensystem
SLN	engl. solid lipid nanoparticles, dt. Feste Lipidnanopartikel
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
u	engl. unified atomic mass unit, dt. atomare Masseneinheit (siehe Dalton)
v.l.n.r.	von links nach rechts
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
WF	Wiederfindung
w/o	engl. without, dt. ohne
Ø	Durchmesser von Partikeln

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	21
2 Allgemeiner Teil	23
2.1 Echtes Johanniskraut	23
2.1.1 Hyperforin	24
2.1.2 Dicyclohexylammonium-Salz	26
2.2 Kolloidale Formulierungen	27
2.2.1 Einteilung der Arzneistoffträgersysteme	28
2.2.1.1 Polymernanopartikel	29
2.2.1.2 Lipidbasierte Nanopartikel	29
2.2.2 Herstellungsverfahren	32
2.2.2.1 Polymernanopartikel	32
2.2.2.2 Lipidbasierte Nanopartikel	33
2.3 Wirkstoffbeladung	35
2.4 Beladungsgeschwindigkeit	35
3 Material und Methoden	39
3.1 Materialien	39
3.1.1 Hyperforin-Dicyclohexylammonium-Salz	40
3.1.2 Rezepturgrundstoffe	41
3.1.2.1 Bovines Serumalbumin	41
3.1.2.2 Hartfett	41
3.1.2.3 Lecithin	42

3.1.2.4	Emulgator	42
3.1.2.5	Mittelkettige Triglyceride	42
3.1.3	Lösungsmittel	43
3.1.3.1	Acetonitril	43
3.1.3.2	Chloroform	43
3.1.3.3	Ethanol	43
3.1.3.4	Wasser	44
3.1.4	Zellkultur	44
3.1.4.1	Dulbeccos Modified Eagles Medium	44
3.1.4.2	Fetales Kälberserum	45
3.1.4.3	HaCaT-Zellen	45
3.2	Methoden	46
3.2.1	Statistische Auswertung	46
3.2.1.1	Shapiro-Wilk-Test	46
3.2.1.2	F-Test	48
3.2.1.3	Zwei-Stichproben-t-Test	49
3.2.1.4	Welch-Test	49
3.2.2	Statistische Versuchsplanung	50
3.2.3	Herstellungsmethoden	53
3.2.3.1	Herstellung der Albumin-Nanopartikel	53
3.2.3.2	Beladungszeitpunkte der Albumin-Nanopartikel . . .	55
3.2.3.3	Herstellung von lipidbasierten Nanopartikeln	55
3.2.3.3.1	Feste Lipidnanopartikel	56
3.2.3.3.2	Nanoemulsionen	58
3.2.3.3.3	Hochdruckhomogenisation	59
3.2.3.3.4	Passive Beladung	61
3.2.3.3.5	Berechnung der HYP-DCHA-Einwaagen . .	62
3.2.4	Analysemethoden	64
3.2.4.1	Identifikation von HYP-DCHA-Abbauprodukten . . .	64
3.2.4.2	Schmelzpunktbestimmungen	66
3.2.4.2.1	Dynamische Differenzkalorimetrie	66

3.2.4.2.2	Mikroskop mit Heiztisch	67
3.2.4.3	Bestimmung des pH-Wertes	67
3.2.4.4	Partikel- bzw. Tröpfchengrößenanalyse	68
3.2.4.4.1	Dynamische Lichtstreuung	68
3.2.4.4.2	Laserdiffraktometrie	70
3.2.4.4.3	Nanopartikel-Tracking-Analyse	71
3.2.4.4.4	Transmissionselektronenmikroskopie	72
3.2.4.5	Bestimmung des Zeta-Potentials	74
3.2.4.6	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von BSA .	75
3.2.4.7	Gehaltsbestimmung	76
3.2.4.7.1	Probenaufbereitung SLN	78
3.2.4.7.2	Kalibriergerade NE	79
3.2.4.7.3	Bestimmung der HYP-DCHA-Konzentration in der äußeren Phase	80
3.2.5	Zellkultur	82
3.2.5.1	Mediumwechsel und Passagieren	82
3.2.5.2	Viabilitätstest	82
4	Ergebnisse und Diskussion	85
4.1	Hyperforin-Dicyclohexylammonium-Salz	86
4.2	Hydrophile Protein-Nanopartikel	90
4.2.1	Herstellung und physikochemische Charakterisierung	90
4.2.1.1	BSA-Reinheit und freier BSA-Anteil in den ANP-For- mulierungen	91
4.2.1.2	Quervernetzung durch Temperatur	95
4.2.1.3	Beladungszeitpunkte	97
4.2.1.4	HYP-DCHA-Konzentration	100
4.2.1.5	ANP-Konzentration	102
4.2.1.6	Lagerstabilität der Formulierungen	105
4.2.2	HYP-DCHA-Stabilität	109
4.2.2.1	Beladungszeitpunkte und HYP-DCHA-Lokalisation .	109

4.2.2.2	Beladungskonzentration	112
4.2.2.3	ANP-Konzentration	117
4.2.2.4	Lagerstabilität	120
4.3	Lipidbasierte Nanopartikel	122
4.3.1	Herstellungsoptimierung	122
4.3.2	Physikochemische Charakterisierung	130
4.3.3	HYP-DCHA Stabilität in der SLN-Formulierung	135
4.3.3.1	Schmelztemperatur der Lipidmatrix	135
4.3.3.2	Stabilität bei der Probenaufbereitung	137
4.3.3.3	Prozessverlust	138
4.3.3.4	Stabilität in der Lipidmatrix	142
4.3.4	HYP-DCHA-Stabilität in der NE-Formulierung	144
4.3.5	Bovines Serumalbumin als Stabilisator	145
4.3.5.1	Partikelgrößenstabilität	146
4.3.5.2	HYP-DCHA-Stabilität in der SLN-Formulierung	148
4.3.5.3	HYP-DCHA-Stabilität in den NE-Formulierungen	150
4.3.6	Passive Beladung	152
4.3.6.1	Vorversuche ohne Arzneistoffträgersysteme	152
4.3.6.2	Beladungskinetik	153
4.3.6.3	Lagerstabilität	155
4.3.6.4	Beladungskinetik mit BSA	156
4.3.6.5	Lagerstabilität mit BSA	159
4.4	Auswirkungen der HYP-DCHA-Formulierungen auf die in-vitro 2D-Kultivierung von Keratinozyten-Zellen	161
4.4.1	HYP-DCHA-Stabilität unter Zellkulturbedingungen und Einfluss auf HaCaT-Zellen	161
4.4.2	Hydrophile Protein-Nanopartikel	162
4.4.3	Lipidbasierte Nanopartikel	164
4.4.3.1	SLN-Formulierungen	164
4.4.3.2	NE-Formulierungen	167

5	Abschlussdiskussion	171
5.1	Hydrophile Proteinnanopartikel	171
5.1.1	Partikelgrößenbestimmung	171
5.1.2	HYP-DCHA-Wiederfindung	172
5.1.3	Einsatz als Darreichungsform	173
5.2	Lipidhaltige Nanopartikel	175
5.2.1	SLN-Formulierungen	175
5.2.2	NE-Formulierungen	176
5.3	Zellkultur	177
5.4	Fazit und Ausblick	178
6	Zusammenfassung	181
7	Summary	185
	Literatur	187
	Lebenslauf	211

1 Einleitung

Hyperforin als Hauptinhaltsstoff des Johanniskrauts ist Gegenstand aktueller Forschungen. So können diesem Wirkstoffmolekül zahlreiche positive Eigenschaften zugesprochen werden, die von stimmungsaufhellenden über antibakterielle bis zu antitumoralen Wirkeigenschaften reichen. Das reine Hyperforin-Molekül ist allerdings aufgrund seiner Instabilitäten praktisch nicht lagerfähig und verarbeitbar. Es oxidiert durch Exposition von Temperatur, Licht und Sauerstoff innerhalb kurzer Zeit. Aus diesem Grund werden alle Untersuchungen mit dem hinreichend stabilisierten Dicyclohexylammoniumsalz durchgeführt. Dies ermöglicht das Arbeiten ohne Schutzatmosphäre und bei Temperaturen von bis zu 60 °C.

Trotz der vielversprechenden therapeutischen Anwendungsgebiete sind aufgrund der Eigenschaften des lipophilen, schwer wasserlöslichen Moleküls bisher nur Johanniskrautextrakte auf dem Markt erhältlich, die viele unterschiedliche Wirkstoffe enthalten. Eine Darreichungsform nur aus Hyperforin existiert nicht.

Das Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, ein Arzneistoffträgersystem zu entwickeln, welches in der Lage ist, das Hyperforin-Molekül möglichst lange vor Umwelteinflüssen und damit vor Oxidationen zu schützen. Ein Fokus liegt dabei auf den Stabilitätsuntersuchungen des Hyperforins mit den unterschiedlichen Arzneistoffträgersystemen.

Die charakterisierten nanopartikulären Systeme lassen sich in mehrere Gruppen unterteilen, wobei im Speziellen Trägersysteme aus den Klassen der Polymer-Nanopartikel und lipidbasierten Nanopartikeln untersucht werden. In der Klasse der Polymer-Nanopartikel werden Albumin-Nanopartikel verwendet, da diese ungiftig, lange erprobt und gut zu verarbeiten sind. Aus der Gruppe der lipidhaltigen Nanopartikel werden zwei unterschiedliche Lipidträger betrachtet, in der zum einen Nanosuspensionen mit festen Lipidnanopartikeln zum Einsatz kommen und zum anderen

Nanoemulsionen, bei denen ein Lipid verwendet wird, welches bei Raumtemperatur flüssig vorliegt. Für möglichst gute pharmakokinetische Eigenschaften wird eine Partikelgröße der Arzneistoffträgersysteme von ca. 100 nm angestrebt.

Die hergestellten kolloidalen Formulierungen eignen sich für mehrere Applikationsarten. Denkbar ist beispielsweise eine kutane Anwendung für entzündliche Hauterkrankungen, weshalb die Formulierungen in der Zellkultur an einem Hautmodell untersucht werden. Obwohl Nanopartikel auf Polymerbasis für verschiedene Wirkstoffe seit langem intensiv erforscht werden, befindet sich zurzeit nur das Assoziat des Zytostatikums Paclitaxel mit Humanalbumin-Nanopartikeln auf dem Markt (Abraxane®). Bei den Lipidnanopartikeln gibt es mittlerweile etwas mehr als zehn zugelassene Fertigarzneimittel [3, Tab. 1].

Dies ist umso erstaunlicher, wenn berücksichtigt wird, dass viele neuartige Wirkstoffe erst durch Arzneistoffträgersysteme sinnvoll applizierbar werden. Des Weiteren können Arzneistoffträgersysteme den Wirkstoff zum Beispiel vor einem Wirkverlust durch vorzeitigen enzymatischen Abbau schützen, schwere toxische Nebenwirkungen bei dem Kontakt mit gesundem Gewebe verhindern, die Überwindung von physiologischen Barrieren (Blut-Hirn-Schranke, Gastrointestinal-Trakt, Zellkompartimente) unterstützen oder eine ungenügende Pharmakokinetik verbessern [4].

Unter diesen Gesichtspunkten ist es daher wichtig, die kolloidalen Formulierungen weiter zu charakterisieren und für neue Arzneistoffe zu validieren. Auch wenn die Ergebnisse dieser Arbeit speziell auf das Hyperforin-Molekül zugeschnitten sind, ist eine Anwendung bei anderen lipophilen Wirkstoffen ebenfalls denkbar. Dies wird um so relevanter, wenn man die moderne Wirkstofffindung berücksichtigt, bei der immer größere und lipophilere Arzneistoffkandidaten identifiziert werden, für welche geeignete Arzneistoffträgersysteme benötigt werden [5].

2 Allgemeiner Teil

Die theoretischen Grundlagen dieser Arbeit und der aktuelle Stand der Technik sind in diesem Kapitel zusammengefasst. Zuerst wird der verwendete Wirkstoff Hyperforin beschrieben, im Anschluss werden kolloidale Formulierungen behandelt und am Ende wird auf die Auflösungskinetik von Arzneistoffen eingegangen. Die theoretischen Aspekte für die durchgeführten Methoden werden im Methodenkapitel ab Seite 46 dargestellt. Dies umfasst unter anderem die statistische Versuchsplanung und die Partikelgrößenanalyse.

2.1 Echtes Johanniskraut

Das Echte Johanniskraut (lat. *Hypericum perforatum* L., engl. St John's wort) wird aufgrund seiner durchscheinenden Öldrüsen auch Tüpfel-Johanniskraut genannt (siehe Abbildungsteil 2.1 (a)). Die Drüsen befinden sich auf den Blüten-, Kelch- und Laubblättern, die Hauptblütezeit liegt um den 24. Juni, dem Johannistag.

Johanniskraut wird in der Regel als alkoholischer Trockenextrakt verwendet. Im DAK Gesundheitsreport von 2015 werden Johanniskrautpräparate nach Traubenzucker und Baldrian als dritthäufigstes rezeptfrei eingenommenes Mittel zur Leistungssteigerung und Aufheiterung genannt [6, S. 109 ff]. Im Jahr 2017 lagen die Arzneimittelnettokosten¹ für Johanniskrautpräparate bei 12 Millionen Euro und damit um 6,9 % höher als 2016. Das Hauptpräparat ist Laif, gefolgt von den teureren Präparaten Neuroplant und Jarsin [7, S. 754]. In dem Zeitraum von August 2005 bis zum Oktober 2019 wurden 222 neue Zulassungen für johanniskrauthaltige Präparate erteilt, wo-

¹ Arzneimittelnettokosten = Bruttoumsatz minus gesetzlicher Hersteller- und Apothekenabschläge

mit in Deutschland seit 1990 insgesamt 730 johanniskrauthaltige Arzneimittel eine Zulassung erhielten [8].

Obwohl Johanniskraut schon von Hippokrates (460-370 v. Chr.) verwendet wurde, sind die vielfältigen Wirkungsmechanismen noch relativ unbekannt. Die heute bekannteste Wirkung gegen leichte und mittelschwere Depression ist erstmals im Lorsch'schen Arzneibuch aus der Zeit um 785 zu finden. Dort wird es gegen Melancholie und als Lautertrank in der Frühlingszeit empfohlen [9, S. 105 ff]. Diese aufhellende Wirkung ist mittlerweile durch In-vitro- und In-vivo-Studien belegt [10, 11]. Welche der vielen Inhaltsstoffe für die antidepressive Wirkung verantwortlich sind, konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden, allerdings ist deren Synergismus den einzelnen Reinsubstanzen überlegen.

Seit dem Beginn der Untersuchung der einzelnen Inhaltsstoffe des Johanniskrauts im 20. Jahrhundert erlebte dieses eine Renaissance, was zu zahlreichen Publikationen und Neuentdeckungen von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten führte [12]. Einer der bekanntesten Hauptinhaltsstoffe des Johanniskrauts ist das Hyperforin, welches in den wässrigen alkoholischen Extrakten einen Anteil von 1 bis 5 % ausmacht [13]. Es wurde 1971 zum ersten Mal von Gurevich et al. aus dem Johanniskraut isoliert und charakterisiert [14].

Für den ethanolischen Johanniskrautextrakt und den Trockenextrakt konnte nachgewiesen werden, dass Hyperforin oral bioverfügbar ist, die Blut-Hirn-Schranke überwindet und nach der Aufnahme nicht schnell metabolisiert bzw. abgebaut wird. So erreichen Filmtabletten mit 300 mg Johanniskrautextrakt (14,8 mg Hyperforin) den maximalen Plasmaspiegel von 150 ng/ml nach 3,5 Stunden und besitzen eine Halbwertszeit von 9 Stunden [15]. Die Dosis von 300 mg Johanniskraut-Trockenextrakt entspricht für die Therapie von leichten bis mittelschweren Depressionen der Einzeldosis bei einer dreimal täglichen Applikation [16].

2.1.1 Hyperforin

Hyperforin gehört zu der Substanzklasse der polyprenylierten polycyclischen Acylphloroglucine und damit zu einer Gruppe von Naturstoffen, die ein breites Spek-

trum wichtiger biologischer Aktivitäten abbilden [17]. Nach IUPAC wird Hyperforin als (1R,5R,7S,8R)-1-Butanoyl-4-hydroxy-8-methyl-3,5,7-tris(3-methylbut-2-enyl)-8-(4-methylpent-3-enyl)bicyclo[3.3.1]non-3-en-2,9-dion [18] benannt und ist im Abbildungsteil (b) der Abbildung 2.1 als Keilstrichformel dargestellt.

Es besteht damit aus einem bicyclischen System mit neun Kohlenstoff-Atomen und zwei Keto-Gruppen. An Position 1 befindet sich die Acyl-Gruppe und an Position 8 die quartäre C-Gruppe. An den Positionen 3, 5 und 7 sind die Prenyl-Reste verortet.

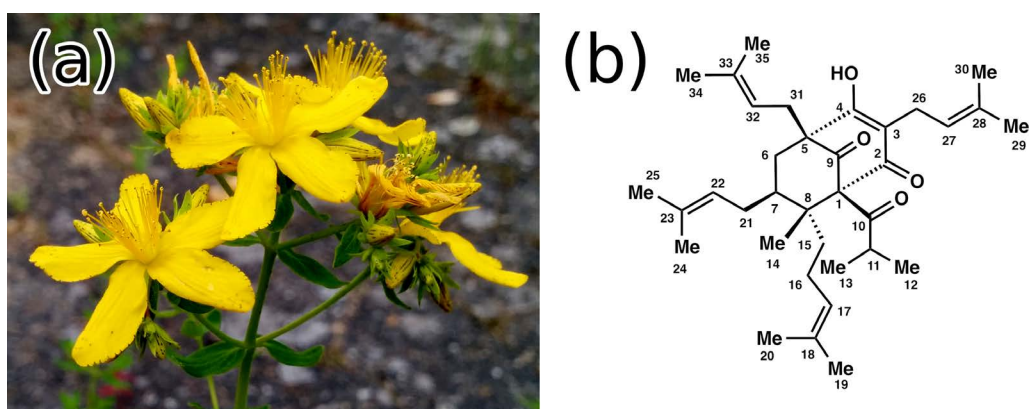


Abbildung 2.1: Abbildungsteil (a): Das Echte Johanniskraut (lat. *Hypericum perforatum* L.) in voller Blüte.

Abbildungsteil (b): Das Hyperforin-Molekül mit der Summenformel $C_{35}H_{52}O_4$ als Hauptbestandteil des Echten Johanniskrauts; Ringnummerierung nach [19].

Hyperforin besitzt neben der bekannten antidepressiven Wirkung [20, 21] weitere positive Eigenschaften, wie zum Beispiel eine antibakterielle [22] und entzündungshemmende [23] Wirkung. Ein breites Forschungsfeld beschäftigt sich des Weiteren mit den antitumoralen Eigenschaften von Hyperforin [24–26]. Forschungen aus dem Jahr 2019 belegen eine zytotoxische Wirkung auf Darmkrebszellen bei In-vitro-Untersuchungen von 3D-Zellmodellen und Mikrotumoren [27].

Die Handhabung von Hyperforin ist sehr schwierig, da das Molekül in den meisten Lösemitteln nahezu unlöslich ist und durch Exposition von Temperatur, Licht sowie Sauerstoff in kurzer Zeit oxidiert bzw. degradiert. In einer Hyperforinlösung

aus Dimethylsulfoxid (DMSO) kommt es beispielsweise innerhalb einer Woche zur Präzipitatbildung [28] und in Hexan wird es innerhalb von drei Tagen bei Zimmertemperatur in Furohyperforin und verschiedene weitere isomere Formen umgewandelt. Nur in protischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Ethanol ist die gelöste Verbindung relativ stabil [29]. Neben dem Furohyperforin sind auch eine Vielzahl weiterer Oxidationsprodukte wie beispielsweise Furohyperforin A und Deoxyfurohyperforin A für das Hyperforin bekannt. Die meisten Oxidationsprodukte entstehen an der C-5-Seitenkette vom Hyperforin, was mit dem β -Dicarbonyl-System begründet wird, da natürliche Analoga, denen dieser Teil fehlt, stabil sind [30–32]. In der Regel verlieren die Oxidationsprodukte des Hyperforins ihre Wirkung, unter anderem die antimikrobielle Aktivität [33].

2.1.2 Dicyclohexylammonium-Salz

Seit Anfang der 2000er Jahre ist das hinreichend stabile Dicyclohexylammoniumsalz für den Laborgebrauch und als Referenzsubstanz verfügbar. In einer Lösung werden die Wirkungen des Hyperforins durch das Salz nicht beeinflusst [34–36]. Unter In-vivo-Bedingungen ist es gut erprobt [37, 38] und auch in gelöster Form in beispielsweise Ethanol, Methanol oder Dimethylsulfoxid bei definierten Lagerbedingungen stabil (siehe Kapitel 4.1). Der Hersteller Phytolab (Vestenbergsgreuth, Deutschland) gibt die Stabilität des Feststoffs bei einer trockenen und dunklen Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 5 Jahren an. Des Weiteren konnte die Stabilität des Hyperforin-Dicyclohexylammoniumsalzes (HYP-DCHA) bei Anwesenheit von Fetalem Kälberserum (fetal calf serum, FCS) in der Zellkultur nachgewiesen werden [39]. Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, ist das HYP-DCHA in einer ethanolischen Lösung über 2 Stunden bei Temperaturen von 40 bis $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabil. Außerdem ist das Salz unempfindlicher gegenüber der Exposition von Licht und Sauerstoff, womit es sich sehr gut als Ausgangswirkstoff für die Formulierungsentwicklung eignet.

Die Hauptverunreinigung des HYP-DCHA ist das Adhyperforin (siehe Materialkapitel 3.1.1), da sich dieses in seiner chemischen Struktur nur durch den Austausch eines Wasserstoff-Atoms gegen eine Methyl-Gruppe am Kohlenstoff-Atom C-12 un-

terscheidet und sich daher schwierig vom Hyperforin abtrennen lässt [40]. Es bildet ebenfalls einen Komplex mit dem Dicyclohexylammonium-Salz aus. Im *Hypericum perforatum* kommt es verglichen mit dem Hyperforin im Verhältnis 1/10 vor [41] (vergleiche Tabelle 3.1 auf Seite 41).

2.2 Kolloidale Formulierungen

Niedermolekulare Wirkstoffe mit einer geringen Wasserlöslichkeit weisen eine niedrige Bioverfügbarkeit auf, weshalb viele potentielle Wirkstoffe schon während des High-Throughput-Screenings (HTS) verworfen werden [42]. Vor über 10 Jahren hatten im Jahr 2007 35 bis 40 % der neuen Leitsubstanzen bei einem pH-Wert von 7 eine Wasserlöslichkeit von unter 10 µmol/l bzw. 5 mg/ml [43]. Zum Vergleich bezeichnet das Ph. Eur. eine Substanz als leicht löslich, wenn sich ein Gramm der Substanz in einem Milliliter Wasser lösen lässt [44]. Nach dem biopharmazeutischen Klassifizierungssystem werden diese schlecht wasserlöslichen Substanzen hinsichtlich ihrer zu erwartenden Bioverfügbarkeit in die Klassen II und IV eingeordnet [45]. Außerdem weisen viele dieser Wirkstoffe nach der Rule of Five von Lipinski et al. und der Erweiterung dieser Regeln nach Ghose et al. eine schlechte orale Bioverfügbarkeit auf, weshalb die Entwicklung applizierbarer Arzneiformen für diese Wirkstoffe eine große Herausforderung darstellt [46, 47].

Durch eine Verkleinerung der Teilchengröße lässt sich die Lösungsgeschwindigkeit (siehe Kapitel 2.4) und in einem gewissen Maße durch die Ostwald-Freundlich-Reifung² auch die Löslichkeit verbessern. Dies steigert besonders bei sehr kleinen Partikeln die Bioverfügbarkeit. Eine solche Formulierung aus kleinen Teilchen oder Tröpfchen im Nano- oder Mikrometerbereich, die fein verteilt im Dispersionsmedium vorliegen, zeigt Brown'sche Bewegung und wird als kolloidale Formulierung bezeichnet. Ab einem Größenbereich von 1 bis 100 nm werden die Teilchen als Nanopartikel bezeichnet. Diese haben besonders vorteilhafte Eigenschaften im Bezug auf

² Partikel mit einem kleineren Radius haben eine höhere Sättigungslöslichkeit als Partikel mit einem größeren Radius. Zur Minimierung der Grenzflächenenergie gehen deshalb kleinere Partikel mit der Zeit in Lösung.

die Liberation, Absorption und Distribution.

Dabei hat die Liberation des Wirkstoffs nach der Applikation einen entscheidenden Einfluss auf die Absorption. Sollte der Wirkstoff sehr schnell aus den Nanopartikeln freigesetzt werden, dann ist die Absorption vergleichbar mit der aus einer Lösung. Bleibt der Wirkstoff hingegen im nanopartikulären System, so verhält er sich analog zu diesem. Dies führt zu vielen weiteren Wechselwirkungen bei der Distribution. So können die Nanopartikel beispielsweise mit anderen Zellen interagieren, in Makrophagen aufgenommen werden und Barrieren wie die Blut-Augen- oder die Blut-Hirn-Schranke überwinden [48]. Aufgrund der für viele Arzneistoffe weitgehend undurchlässigen Blut-Hirn-Schranke ist eine Therapie zum Beispiel bei einem Gehirntumor vergleichsweise schwierig. Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme zwischen 50 und 300 nm sind mit einer passenden Oberflächencharakteristik in der Lage, über die rezeptorvermittelte Transzytose ins Gehirn zu gelangen, was die Realisierung einer Chemotherapie ermöglicht [49]. Des Weiteren konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die geringe Hautpenetration durch Nanopartikel verbessert wird. Sie können Arzneistoffe gezielt in bestimmte Hautregionen wie die Epidermis oder in Hautanhangsgebilde transportieren [50–53]. In Kapitel 4.4 wurde deshalb der Einfluss der verwendeten kolloidalen Formulierungen in einem Zellkulturmodell an Keratinozyten-Zellen untersucht.

2.2.1 Einteilung der Arzneistoffträgersysteme

Nanopartikuläre Arzneistoffträgersysteme sind nicht nur vielseitig applizierbar und mit ganz neuen Verfahren charakterisierbar, es gibt auch viele unterschiedliche Typen. Grob lassen sie sich in Wirkstoff-, Polymer- und Lipidnanopartikel unterteilen [54]. Die Wirkstoffnanopartikel kommen ohne Trägerstruktur aus und werden auch als „Brick Dust“ Moleküle bezeichnet, da sie praktisch unlöslich sind. Die Herstellung erfolgt in der Regel durch Nassmahlung in Rührwerkskugelmøhlen. Da vermutet werden kann, dass das instabile Hyperforin-Molekül in diesem System nicht ausreichend stabilisiert wird, wurden Wirkstoffnanopartikel in dieser Arbeit nicht thematisiert.

2.2.1.1 Polymernanopartikel

Die Polymernanopartikel bestehen entweder aus natürlichen Polymeren, wie dem hier verwendeten Albumin oder aus synthetischen Polymeren wie dem Polycyanoacrylat. Mit der Wahl des Trägermaterials kann die Wirkstofffreigabe zum Beispiel durch Diffusion bzw. durch Erosion des Polymers gesteuert werden. Allgemein wird zwischen einer Verkapselung von festen oder flüssigen Wirkstoffen und einer Einbettung in die Polymermatrix unterschieden.

Für die Herstellung der hier verwendeten hydrophilen Proteinanopartikel kam als Polymer bovines Serumalbumin (BSA) zum Einsatz. Im Zusammenhang mit dem Wirkstoff Hyperforin ist bekannt, dass BSA den für die Oxidation empfindlichen enolierten Phloroglucin-Ring (siehe Kapitel 2.1.1) schützt [55]. Die Art der Verkapselung bzw. Einbettung des Wirkstoffs in oder an die Polymernanopartikel ist nicht eindeutig und wird deshalb in Kapitel 4.2.2.2 diskutiert. Darüber hinaus stellen Albumin-Nanopartikel (ANP) aufgrund ihrer breiten Anwendung als Arzneistoffträgersysteme eine gut erprobte und einfach herzustellende, kolloidale Formulierung dar [56, 57]. Albumin ist ungiftig, nicht immunogen, biokompatibel und biologisch abbaubar [58]. Trotz dieser langjährigen Erfahrungen sind ANP noch immer Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. So konnte in einer Studie aus dem Jahr 2018 zum ersten Mal gezeigt werden, dass ANP mit einer Größe von 150 nm oral applizierbar sind und dabei einem anderen Zellaufnahmeweg unterliegen als einfache Albuminlösungen [59]. Auch in der Onkologie wird zurzeit intensiv an der Entwicklung neuer Darreichungsformen auf Basis von ANP geforscht [60]. Insbesondere aufgrund ihrer hohen Bindungsfähigkeit für verschiedene Wirkstoffe, guten Verträglichkeit und einem geringen Nebenwirkungsprofil sollten sich ANP als Arzneistoffträgersysteme insbesondere auch für Hyperforin eignen [61, 62].

2.2.1.2 Lipidbasierte Nanopartikel

Die Lipidnanopartikel als weiteres Arzneistoffträgersystem bilden natürliche Matrices für lipophile Wirkstoffe und gehören zu den vielversprechendsten Formulierungsansätzen für schwer wasserlösliche Arzneimittel wie beispielsweise Propofol [5, 63].

Sie werden auch als „Grease Ball“ Moleküle bezeichnet und weisen eine besonders hohe physiologische Kompatibilität auf, da sie den natürlichen Lipidnanopartikeln in unserem Körper ähneln. Diese körpereigenen cholesterinreichen Lipoproteine bestehen aus nicht-kovalenten Aggregaten von Proteinen, Cholesterin, Triglyceriden und Phospholipiden. Sie werden nach ihrer Dichte benannt und sind zum Beispiel als Low Density Lipoprotein (LDL) oder als High Density Lipoprotein (HDL) bekannt. Ihre Größe variiert zwischen 7 und ca. 50 nm.

Außerdem kann man bei Lipidnanopartikeln auf eine langjährige Erfahrung in der Nahrungsmittelindustrie zurückgreifen. Dort werden diese unter anderem für bioaktive lipophile und chemisch instabile Verbindungen wie Carotinoide verwendet [64, 65]. In der parenteralen Ernährung finden Lipidemulsionen ebenfalls seit langem Verwendung [66, 67]. Eine weitere Form sind die bei Raumtemperatur festen lipidhaltigen Arzneistoffträgersysteme (solid lipid nanoparticles, SLN), welche seit Anfang der 1990er bekannt sind [68–70].

Darüber hinaus existieren noch viele weitere Formen wie die mizellaren Dispersionen und Liposomen, die oft aus Phospholipiden bestehen, die selbst (mikro)emulgierenden Systeme, die erst beim Kontakt mit Körperflüssigkeiten ein Emulsionssystem ausbilden, oder die flüssigkristallinen Lipid-Nanopartikel, die bedingt durch ihren hohen Ordnungsgrad eine relativ hohe Viskosität und damit eine eingeschränkte Mobilität der eingeschlossenen Wirkstoffmoleküle aufweisen [71].

Bei der Vielzahl der Systeme stellt sich die Frage, welches davon für die Formulierung des Wirkstoffs HYP-DCHA geeignet ist. Diese Frage lässt sich nicht pauschal beantworten und ist Gegenstand aktueller Forschung [72]. Aufgrund der vielen möglichen lipidbasierten Trägersysteme werden folgend nur die verwendeten festen Lipidnanopartikel (SLN) und die Nanoemulsionen (NE) genauer beschrieben.

Die SLN (siehe Abbildung 2.2) besitzen im Vergleich zu den flüssigen Nanoemulsionen eine größere Oberfläche bei gleichem Lipidanteil. Dies liegt daran, dass sich flüssige Tröpfchen aufgrund der Oberflächenspannung zu einer möglichst kleinen Oberfläche zusammenlagern, was geometrisch einer Kugel entspricht. Die auskristallisierte SLN-Formulierung bildet hingegen längliche Plättchen aus (vergleiche Abbildung 4.10 auf Seite 131). Diese Oberflächenunterschiede können einen Einfluss auf die

Beladungskapazität von grenzflächenaktiven, in der Regel amphiphilen Molekülen haben. So ist beispielsweise die Beladungskapazität des Antimykotikums Amphotericin B bei festen Lipidnanopartikeln im Vergleich zu Nanoemulsionen fast verdoppelt [73]. Außerdem verändert das bei Körpertemperatur feste Lipid die Wirkstofffreisetzung im Körper. Diese wird im Vergleich zu einem flüssigen Lipid nicht mehr durch Diffusion, sondern durch den biologischen Abbau des Partikels kontrolliert [74].

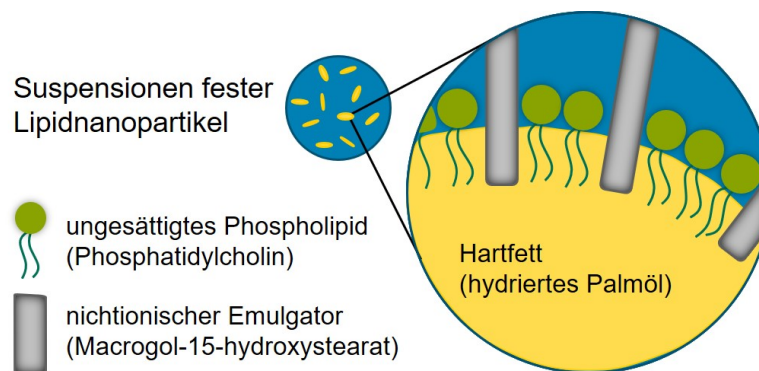


Abbildung 2.2: Die schematische Darstellung des Aufbaus von festen unbeladenen Lipidnanopartikeln (SLN), die nach der Homogenisierung und Abkühlung aus einer Nanoemulsion auskristallisieren und die nanopartikuläre Suspension bilden (siehe Kapitel 2.2.2.2).

In die flüssigen NE lässt sich in der Regel mehr Wirkstoff aufnehmen, da der Wirkstoff bei den festen Lipidnanopartikeln durch die hohe Ordnung der Lipidmoleküle oft nur mit der Oberfläche interagieren kann bzw. mit der Zeit an die Grenzfläche gedrückt wird [75, 76]. Dafür neigen feste Lipidnanopartikel nicht zu einem Partikelgrößenwachstum durch Koaleszenz und haben dementsprechend eine höhere Lagerstabilität. Bei der Wahl eines geeigneten Arzneistoffträgersystems spielt deshalb neben der Beladungskapazität auch die erwünschte Eigenschaft des Systems in der späteren Darreichungsform eine entscheidende Rolle. Aufgrund der großen Unterschiede zwischen den SLN und NE dienen diese beiden Systeme als Ausgangspunkt zur Beurteilung von lipophilen Arzneistoffträgersystemen für das schwer lösliche HYP-DCHA (siehe Kapitel 4.3).

2.2.2 Herstellungsverfahren

Die folgenden Herstellungsverfahren geben einen Einblick in die vielfältigen technologischen Möglichkeiten, nanopartikuläre Systeme zu produzieren. Die Details der Herstellungsmethoden der hier verwendeten ANP, SLN und NE sind in Kapitel 3.2 beschrieben.

2.2.2.1 Polymernanopartikel

Für die Polymernanopartikel gibt es zwei grundlegende Herstellungsverfahren. Das erste Verfahren beruht auf einer Polymerisation. Dabei wird zwischen Emulsions-Polymerisation und Grenzflächen-Polymerisation unterschieden. Bei der Emulsions-Polymerisation wird der Wirkstoff in einer Monomerlösung, die die innere Phase einer Öl-in-Wasser-Emulsion darstellt, verteilt, wodurch er bei der Polymerisation in die Polymermatrix eingebettet wird. Alternativ kann der Wirkstoff nach der Polymerisation hinzugegeben werden, dann adsorbiert er hauptsächlich an den Polymergrenzflächen. In beiden Fällen entstehen Nanosphären. Wird das Monomer einer Öl-in-Wasser Nanoemulsion hinzugefügt, dann lagert sich dieses an den Grenzflächen der Emulsion an und es entstehen nach der Grenzflächen-Polymerisation Nanokapseln. Hier wird der in der Ölphase gelöste Wirkstoff von einer Polymerschicht eingeschlossen und nicht wie bei den Nanosphären in der Matrix bzw. der Oberfläche des Polymers eingebettet.

Nachteilig an diesen Verfahren ist, dass die durch Polymerisation hergestellten Partikel toxische Rest-Monomere enthalten können, weshalb die hier verwendete Methode auf dem zweiten grundlegenden Herstellungsverfahren, der Dispergierung des Polymers, beruht. Dafür wurde für die Herstellung von Albumin-Nanopartikeln die Desolvationsmethode mit Ethanol verwendet. Ab einem Anteil von 40 % Ethanol denaturiert das Molekül, da die zur Aufrechterhaltung der Struktur erforderlichen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen gestört werden [77]. Darüber hinaus sinkt die Löslichkeit des Albumins, bis dieses schließlich ausfällt und die entfalteten Proteine aggregieren und Albumin-Nanopartikel bilden [78]. Für eine definierte Partikelgröße muss dies unter kontrollierten Bedingungen hinsichtlich des pH-Wertes, der BSA-Konzentration, der Salzkonzentration sowie der

Zutropfgeschwindigkeit und der Art des Desolvatationsmittels erfolgen (vergleiche Kapitel 3.2.3.1) [79, 80]. Zur anschließenden Stabilisierung der ANP werden diese in der Regel mit Glutaraldehyd quervernetzt [81, 82]. Da Glutaraldehyd bekanntermaßen eine reizende Wirkung, eine Sensibilisierung der Haut und der Atmungsorgane sowie andere Symptome hervorruft [83], wurden die ANP hier durch Hitze stabilisiert [84]. Die Temperatur und die Dauer der Temperatureinwirkung haben dabei auch wieder einen Einfluss auf die Partikelgröße. Bei etwa 60 °C ist dieser Einfluss noch zu vernachlässigen, bei 80 °C steigt die Partikelgröße allerdings fast linear mit der Dauer der thermischen Behandlung an [85, 86]. Die hier verwendete Temperatur von 60 °C über 2 Stunden hatte keinen Einfluss auf die Partikelgröße (siehe Tabelle 4.2 auf Seite 95).

2.2.2.2 Lipidbasierte Nanopartikel

Abhängig von dem Aggregatzustand der Lipidphase bei Raumtemperatur sind unterschiedliche Herstellungsverfahren möglich. Nanoemulsionen werden in der Regel durch eine Hochdruckhomogenisation hergestellt. Für diese Arbeit wurde dafür die Lösungsmethode verwendet, bei der der Emulgator in der äußeren Phase gelöst vorliegt und die innere Phase in diese emulgiert wird. Die erste Stufe der dafür nötigen Homogenisierung, also das Zuführen von Energie gegen die Grenzflächenkräfte, erfolgt durch ein Ultra-Turrax-Gerät, um eine hydromechanische Stoffzerteilung zu erzielen und neue Grenzflächen auszubilden. Dieses Rotor-Stator-System führt durch regelbare Scher-, Schlag- und Pralleffekte sowie durch ein hydrodynamisches Potenzialgefälle mit hochwirksamen Turbulenzen in einer Wirbelkammer zu einer Zerteilung der inneren Phase bis in den unteren Mikrometerbereich. Der zweite Homogenisierungsschritt erfolgt in einem Hochdruckhomogenisator. Hier wird die voremulgierte Formulierung von einem Kolben angesaugt und unter hohem Druck durch mehrere Engstellen oder Düsen gepresst. Die innere Phase wird durch Scher- und Trägheitskräfte in turbulenter Strömung sowie durch Prallströmungen, Kavitation und Scherkräfte in laminarer Dehnströmung zerteilt [87]. Die Geometrie der Engstellen kann stark variieren und beeinflusst entscheidend die resultierende Tröpfchengröße. In Abhängigkeit von der Strömungsführung werden die Hochdruckhomogenisatoren in Radialdiffusoren, Ge-

genstrahldispersatoren und in axial durchströmte Düsenaggregate unterschieden. Durch den hohen Energieeintrag erwärmt sich die Emulsion, was sich auf die Stabilität des eingesetzten Wirkstoffs auswirken kann. Alleine bei der Kavitation können Temperaturspitzen von bis zu 10^4 K auftreten [88].

Industrielle Homogenisatoren haben einen Produktionsmaßstab für kolloidale Teilchen von mehreren 1000 l/h. Aufgrund der geringen Versuchsvolumina wurde für die Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten lipidbasierten Nanopartikel eine Hochdruckhomogenisation in einem Mikrokanal auf Basis eines axial durchströmten Düsenaggregates durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.3.3). Das hierfür benötigte Probenvolumen lag bei nur 15 ml.

Neben den klassischen Homogenisatoren gibt es auch weitere Arten der Homogenisation, wie die Membranemulgierung. Hierbei wird durch Extrusion an einer porösen Membran eine Voremulsion in kleinere Tröpfchen zerteilt. Die Partikelgröße korreliert dabei mit der Benetzbarkeit der verwendeten Membran. Diese besteht zum Beispiel aus anorganischen Materialien wie Aluminiumoxid, da dieses sich mit vielen unterschiedlichen Lipid-Wasser-Emulgator-Gemischen benetzen lässt [89].

Als letzte Homogenisierungsmöglichkeit sei Ultraschall genannt. Dieses diskontinuierliche Verfahren erzeugt mit Ultraschallsonotroden Kavitation und Mikroturbulenzen, die die innere Phase zerkleinern [87]. Die Wahl der Herstellungsmethode hängt maßgeblich von der Empfindlichkeit der verwendeten Wirk- und Hilfsstoffe gegenüber Hitze und Scherung ab.

Für die Herstellung von festen lipidbasierten Nanopartikeln kann ebenfalls eine Hochdruckhomogenisation verwendet werden. Dafür muss das Lipid allerdings aufgeschmolzen werden, weshalb die Methode auch als Schmelz-Homogenisation bezeichnet wird. Es entsteht nach der Homogenisierung zunächst eine Nanoemulsion, aus der die kolloidalen Lipidpartikel nach dem Abkühlen auskristallisieren.

Alternativ dazu kann die Kalt-Homogenisation verwendet werden, bei der die erstarrte Lipidmatrix, in der sich der Wirkstoff befindet, zuerst zu Nanopartikeln gemahlen und anschließend in eine wässrige Phase dispergiert wird [65]. Eine weitere Alternative für die SLN-Herstellung sind Fällungsmethoden, die sich zum Beispiel in einem Mikrosystem durchführen lassen [90]. Aber auch durch das Verdampfen von

organischen Lösungsmitteln aus der inneren Phase einer Öl-in-Wasser Emulsion sind kolloidale Präzipitate produzierbar [91].

2.3 Wirkstoffbeladung

Das Standardverfahren zur Wirkstoffbeladung von kolloidalen Dispersionen ist die Einarbeitung des Wirkstoffes in die Lipidphase. Danach erfolgt die Mischung mit der Wasserphase, die Vordispersierung und abschließend die Feindispersierung. Diese Methode wird als direkte Beladung bezeichnet und kann nur bei ausreichend hoher Stabilität des Wirkstoffes verwendet werden (siehe Kapitel 2.2.2).

Alternativ dazu können die Arzneistoffträgersysteme auch ohne Wirkstoff produziert und nachträglich passiv beladen werden (siehe Methodenkapitel 3.2.3.3.4). Dazu werden die leeren Arzneistoffträgersysteme mit einem Überschuss an Wirkstoff versetzt. Nach einer gewissen Einwirkzeit wird dieser Wirkstoff wieder vom System abgetrennt und die Beladungskapazität der einzelnen Trägersysteme bestimmt. Diese Methode eignet sich auch für ein Screening unterschiedlicher Arzneistoffträgersysteme [92]. Die Beladungskinetik der Trägersysteme lässt sich hauptsächlich durch Diffusion und damit mit der Noyes-Whitney-Gleichung 2.4.4 im nächsten Kapitel auf Seite 38 beschreiben [93].

2.4 Beladungsgeschwindigkeit

Damit sich ein Feststoff in einem Lösungsmittel lösen kann, müssen im ersten Schritt die Anziehungskräfte zwischen den Feststoffmolekülen überwunden werden. Die dafür benötigte Energie entspricht der Verdampfungswärme des Feststoffmoleküls. Bei kristallinen Stoffen ist diese Energie höher als bei amorphen Stoffen. Im nächsten Schritt müssen die Anziehungskräfte der Flüssigkeit überwunden werden, damit ein *Hohlraum* für das Feststoffmolekül entsteht. Es folgt die Solvation, bei der sich die Lösungsmittelmoleküle um das zu lösende Feststoffmolekül lagern. Dies sorgt für eine Energiefreisetzung, die der Stärke der entstehenden Wechselwirkungen zwischen dem

Feststoffmolekül und den Flüssigkeitsmolekülen entspricht. Wird bei der Solvation mehr Energie frei als bei der Überwindung der Feststoff- und der Flüssigkeitsanziehungskräfte aufgebracht wurde, dann läuft der Lösungsprozess exotherm ab. Ist die Energiebilanz negativ, dann findet ein endothermer Lösungsprozess statt. Der letzte Schritt ist die durch eine Entropiezunahme begünstigte Diffusion zum Konzentrationsausgleich. Dieser Vorgang wird oft als geschwindigkeitsbestimmender Schritt beschrieben und hat einen großen Einfluss auf die Beladungskinetik (siehe Kapitel 4.3.6) [92, 93]. Es wird davon ausgegangen, dass der Lösungsprozess dadurch verlangsamt wird, dass sich um den Feststoffpartikel eine gesättigte Lösung einstellt, weshalb keine weiteren Feststoffmoleküle mehr vom Lösungsmittel aufgenommen werden können. Erst durch die Diffusion werden die Feststoffmoleküle abtransportiert und wieder Platz für neue Feststoffmoleküle geschaffen.

Damit sich der gelöste Stoff im Lösungsmittel verteilen kann, muss er von der Teilchenoberfläche über eine Diffusionsschicht mit abnehmender Konzentration in das durchmischte Lösungsmittel wandern. Diese Diffusion lässt sich mit dem Ersten Fick'schen Gesetz (Gleichung 2.4.1, eindimensional in x -Richtung, Druck und Temperatur konstant) beschreiben. Hierbei ist die Massenstromdichte j die Masse m der Teilchen, die sich pro Zeitintervall t durch eine senkrecht zur Diffusionsrichtung liegenden Fläche A bewegen. Diese Fläche A entspricht der Grenzfläche zwischen der zu lösenden Substanz und dem Lösungsmittel.

Die Massenstromdichte j ist abhängig vom Konzentrationsgradienten $\frac{\partial c}{\partial x}$ und dem Diffusionskoeffizienten³ D . Bei konstantem Konzentrationsgradienten (stationärer Fall) kann der partielle Differentialquotient $\frac{\partial c}{\partial x}$ in eine gewöhnliche Differentialgleichung $\frac{dc}{dx}$ überführt werden, da die Konzentration nur noch von der Dimension x und nicht mehr von der Zeit t abhängt $c(x, t) \rightarrow c(x)$.

³ Der Diffusionskoeffizient D lässt sich mit der Stokes-Einstein-Gleichung 3.2.13 auf Seite 68 berechnen.

$$j = \frac{dm}{A \cdot dt} = -D \frac{\partial c}{\partial x}$$

$$j = -D \frac{dc}{dx} \quad (2.4.1)$$

Damit beschreibt das Erste Fick'sche Gesetz ein Fließgleichgewicht, also eine zeitlich unabhängige Darstellung des Massenstroms j , welche proportional zum Konzentrationsgradienten $\frac{dc}{dx}$ ist. Wird weiterhin angenommen, dass die Krümmung des Konzentrationsverlaufs ebenfalls null ist⁴, dann kann der Konzentrationsverlauf als gerade und damit als Differenz wie in Gleichung 2.4.2 dargestellt werden.

$$j = -D \frac{\Delta c}{\Delta x} \quad (2.4.2)$$

Wird die Dicke der Diffusionsschicht h , die das Teilchen umgibt, ebenfalls als konstant betrachtet, dann ist $\Delta x = h$. Die Konzentrationsdifferenz Δc kann durch die beiden Stoffkonzentrationen c_s und c_t ersetzt werden. Dabei entspricht die Sättigungskonzentration c_s der Stoffkonzentration an der Teilchenoberfläche $c_{x=0}$. Die Konzentration c_t beschreibt die Stoffkonzentration im ideal durchmischten Lösungsmittel an der Diffusionsschicht $c_{x=h}$, wobei für ein ideal durchmisches Lösungsmittel $c_{x=h} = c_{x>h}$ gilt. Durch diese Annahmen ergibt sich Gleichung 2.4.3.

$$j = -D \frac{\Delta c}{\Delta x} = -D \frac{c_s - c_t}{0 - h} = D \frac{c_s - c_t}{h} \quad (2.4.3)$$

Durch Multiplikation der Gleichung 2.4.3 mit der Teilchenoberfläche A bildet sich schlussendlich die Noyes-Whitney-Gleichung 2.4.4.

⁴ Dass die Krümmung des Konzentrationsverlaufs null ist, lässt sich über das Zweite Ficksche Gesetz herleiten, bei dem im stationären Fall die 2. Ableitung nach $\frac{\partial}{\partial x}$ von $\frac{\partial c}{\partial x}$ null wird: $\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} = 0$.

$$\begin{aligned} j \cdot A &= \frac{dm}{A \cdot dt} \cdot A = D \cdot A \frac{c_S - c_t}{h} \\ \frac{dm}{dt} &= \frac{D}{h} \cdot A \cdot (c_S - c_t) \end{aligned} \quad (2.4.4)$$

Durch Division der Noyes-Whitney-Gleichung mit dem Volumen der Lösung V wird diese oft als Nernst-Brunner-Gleichung (Gleichung 2.4.5) bezeichnet.

$$\frac{dc}{dt} = \frac{D \cdot A}{h \cdot V} (c_S - c_t) \quad (2.4.5)$$

Mit der Anfangsannahme, dass die Diffusion der gelösten Substanz von der Diffusionsschicht h in das Lösungsmittel der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Lösungsprozesses ist und keine Grenzflächenphänomene auftreten, lässt sich mit der Noyes-Whitney- bzw. Nernst-Brunner-Gleichung die Lösungsgeschwindigkeit dc/dt eines Stoffes beschreiben. Diese Änderung der Konzentration pro Zeiteinheit ist abhängig von der Sättigungslöslichkeit des Stoffes im Lösungsmittel c_S , der Konzentration des Stoffes c_t im Lösungsmittel zur Zeit t und den Konstanten D , h und A . Zu beachten ist bei den Berechnungen, dass sich die vermeintlichen Konstanten ändern können. So wird beispielsweise die Teilchenoberfläche A während des Lösungsvorganges kleiner, weshalb die Lösungsgeschwindigkeit abnimmt.

Aus der Noyes-Whitney- bzw. Nernst-Brunner-Gleichung geht hervor, dass die Lösungsgeschwindigkeit umso höher ist, je niedriger die Stoffkonzentration im Lösungsmittel ist. Sollte sich die Konzentration im Lösungsmittel nicht ändern $c_S - c_t = \text{konstant}$ und die Diffusionsschicht h konstant bleiben, dann spricht man von Sinkbedingungen. Diese liegen definitionsgemäß vor, wenn die Stoffkonzentration im Lösungsmittel unter 10 % der Sättigungskonzentration liegt ($c_t < 10 \% c_S$).

3 Material und Methoden

Anmerkungen und Definitionen: Diese Arbeit orientiert sich an den Schreib- und Gestaltungsregeln der DIN 5008 [94, 95]. Die Beschriftung von Tabellenköpfen und Koordinatenachsen erfolgt nach DIN 55301 [96].

Wenn nicht anders angegeben, dann beziehen sich alle Konzentrationsangaben in dieser Arbeit auf Massenanteile ω , um Dichte- und damit Volumenveränderungen durch Temperaturschwankungen zu vermeiden (Gleichung 3.0.1).

$$\omega_i = \frac{m_i}{\sum_{k=1}^n m_k} \quad (3.0.1)$$

Die Begriffe Wirkstoff, Arzneistoff und Active Pharmaceutical Ingredient (API), dt. Wirkstoff im Arzneimittel, dem die arzneiliche Wirkung zugeschrieben wird, werden synonym verwendet und beziehen sich immer auf die Substanz, die in einem Organismus eine spezifische pharmakologische Wirkung hervorrufen kann. Als Arzneimittel wird die fertige Darreichungsform bezeichnet, die sowohl Wirkstoffe als auch Hilfsstoffe enthalten kann und für die Applikation bestimmt ist.

3.1 Materialien

Dieses Kapitel listet die verwendeten Chemikalien, Wirkstoffe und Lösungsmittel auf und gibt einen kurzen Überblick über ihre Eigenschaften. Des Weiteren sind die für die Herstellung der Nanopartikel verwendeten Geräte aufgeführt sowie die für die Zellkultur benötigten Utensilien. Kleingeräte und Substanzen, die keine weitere Erläuterung benötigen, sind mit den Herstellerangaben im Methodenteil aufgelistet.

3.1.1 Hyperforin-Dicyclohexylammonium-Salz

Zur Beladung der Arzneistoffträgersysteme wurde das stabilisierte Dicyclohexylammonium-Salz des Hyperforins verwendet (Phytolab, Vestenbergsgreuth, Deutschland, Charge: 7876). Hyperforin ist eine Phytochemikalie, die aus den Pflanzen der Hypericum-Familie extrahiert und anschließend mit dem Dicyclohexylammonium-Salz stabilisiert wird. Der Schmelzpunkt liegt bei 70-80 °C, die mit ALOGPS berechnete Wasserlöslichkeit beträgt 0,000 632 mg/ml und die orale toxische Dosis bei Ratten (LD₅₀) hat einen Wert von 5628 mg/kg Körpergewicht [97].

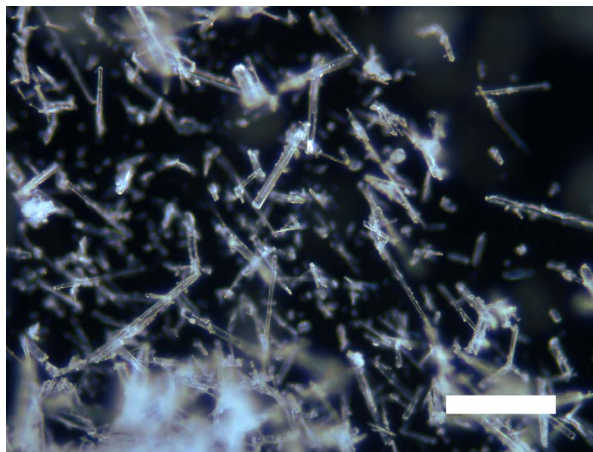


Abbildung 3.1: Dunkelfeldaufnahme von HYP-DCHA-Kristallen in einer 200-fachen Vergrößerung. Der Maßstabsbalken hat eine Länge von 100 µm.

Die Dunkelfeldmikroskopieaufnahme in Abbildung 3.1 zeigt HYP-DCHA-Kristalle in einer 200-fachen Vergrößerung. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten kommt im HYP-DCHA auch immer ein Anteil an Adhyperforin-DCHA vor. Die genaue Zusammensetzung lässt sich dem Analysenzertifikat von Phytolab in Tabelle 3.1 entnehmen.

Substanz	Anteil in %	Molare Masse in g/mol
Hyperforin	61,30	535,79
Adhyperforin	12,90	549,82
DCHA	25,14	182,33
Hyperforin-DCHA	82,10	718,12
Adhyperforin-DCHA	17,23	732,15

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des HYP-DCHA aus dem Analysenzertifikat von Phytolab, Charge: 7876.

3.1.2 Rezepturgrundstoffe

3.1.2.1 Bovines Serumalbumin

Das Bovine Serumalbumin (BSA, albumin fraction V, Merck KGaA, Deutschland, CAS-No: 90604-29-8, Charge: K45075418 414) hat in wässrigen Lösungen einen pH-Wert von 6,8 bis 7,2 (isoelektrische Punkt bei pH-Wert 4,7 [98]), eine molare Masse von ca. 66 000 g/mol und wurde bei 8 °C, entsprechend den Herstellerangaben, gelagert. BSA wird aus frischem Rinderplasma hergestellt (siehe Kapitel 3.1.4.2). Die Fraktionierung erfolgt nach Cohn, wobei mit immer höheren Ethanolkonzentrationen einzelne Plasmabestandteile ausgefällt werden. Die letzte Fraktion ist die Fraktion V, bei der das Albumin ab einem Ethanolgehalt von 40 % im Plasma unlöslich wird und auskristallisiert. Die biologische Aktivität des BSA bleibt dabei erhalten. Nach der Trocknung werden schwach gelbliche Blättchen erhalten. Das BSA wurde sowohl für die Herstellung von hydrophilen Protein-Nanopartikeln als auch als Additiv in den lipidbasierten Arzneistoffträgersystemen eingesetzt.

3.1.2.2 Hartfett

Softisan® HS154 ist ein hydriertes Palmöl (IOI Oleo GmbH, Hamburg, Deutschland, Charge: 006083), welches als Hartfett für die Lipidmatrix der festen Lipidnanopartikel verwendet wurde. Es besteht aus natürlichen, hydrierten Triglyceriden mit geradkettigen, unverzweigten Fettsäuren, die einen Schmelzpunkt von ca. 55 - 60 °C aufweisen.

3.1.2.3 Lecithin

Phospholipon® 90 G (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Deutschland, Charge: 228154-3140017) wurde als Phospholipid ebenfalls für die Lipidmatrix der festen Lipidnanopartikel verwendet. Es handelt sich dabei um ein gereinigtes, granuliertes und entöltes Soja-Lecithin mit einem Anteil von > 94 % Phosphatidylcholin, < 4 % Lysophosphatidylcholin und < 3 % Tocopherol.

Das Hauptanwendungsgebiet des amphoteren Tensids ist die Stabilisierung parenteraler Fettemulsionen, da Lecithine als körpereigene Substanzen und Bestandteile von Zellmembranen gut verträglich und metabolisierbar sind.

Das Lecithin wurde freundlicherweise von der Lipoid GmbH zur Verfügung gestellt.

3.1.2.4 Emulgator

Solutol® HS15 ist ein Macrogol-15-hydroxystearat (BASF, Ludwigshafen, Deutschland, Charge: 16484447G0), welches als nichtionischer Emulgator in der wässrigen, äußeren Phase der lipophilen Arzneistoffträgersysteme Anwendung fand. Macrogol-15-hydroxystearat besteht aus einer Mischung von Mono- und Diestern der 12-Hydroxystearinsäure (= lipophiler Anteil) und etwa 30 % des freiem Macrogols (Polyethylenglycol = hydrophiler Anteil), welches durch Ethoxylierung der 12-Hydroxystearinsäure umgesetzt wird. Der Zahlenwert 15 gibt die molare Menge an umgesetztem Ethylenoxid pro Mol 12-Hydroxystearinsäure an.

Das 1992 entwickelte Solutol® HS15 findet in vielen Ländern, beispielsweise in Argentinien oder Kanada in Injektionspräparaten Anwendung [99]. Aufgrund seiner guten Eigenschaft als Lösungsvermittler wird es in verschiedenen Drug-Delivery-Systemen wie festen Lipid-Nanopartikeln, Mizellen, Liposomen oder Micro- und Nanoemulsionen eingesetzt [100].

3.1.2.5 Mittelkettige Triglyceride

Miglyol® 812 (Caesar & Lorenz GmbH, Hilden, Deutschland, Charge: 15379613) ist ein flüssiges mittelkettiges Triglyceridgemisch (Medium-chain triglycerides, MCT), wel-

ches aus gesättigten Fettsäuren einer aliphatischen Kette von 8-12 Kohlenstoffatomen besteht [101]. Miglyol® 812 besitzt eine Dichte von 0,947 g/ml, eine Verseifungszahl¹ von 331 und eine Viskosität von 30 mPas. Es wurde als flüssiges Lipid für die Nanoe-mulsionen verwendet.

3.1.3 Lösungsmittel

3.1.3.1 Acetonitril

Das organische Lösungsmittel Acetonitril (HPLC grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten) ist das einfachste organische Nitril. Es wurde hier als Fließmittelbestandteil in der HPLC-Analytik benutzt. In der eluotropen Reihe liegt die Polarität unterhalb von Wasser, was die Elutionskraft an der verwendeten Umkehrphase erhöht.

3.1.3.2 Chloroform

Das Trichlormethan (HPLC grade, Fisher Scientific, Loughborough, England) fand als Lösungsmittel für die SLN-Matrix Verwendung. Die klare, farblose Flüssigkeit ist schwer in Wasser löslich, aber gut mischbar mit Ethanol. Die Dichte beträgt 1,48 g/ml.

3.1.3.3 Ethanol

Ethanol (absolute HPLC grade, Fisher Scientific, Loughborough, UK) liegt chemisch gesehen zwischen Wasser und Toluol. Mit seiner OH-Gruppe bildet Ethanol einen molekularen Dipol aus und besitzt daher ähnliche Eigenschaften wie Wasser. Demzufolge ist es auch in jedem Verhältnis mit Wasser mischbar. Die dabei auftretende exotherme Lösungsreaktion beruht auf einer Volumenkontraktion durch Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen. Aus diesem Grund kann der Alkoholgehalt einer Mischung auch nicht über die Messungen des Volumens erfolgen, sondern nur über eine Dichte- oder Siedepunktsbestimmung. Durch das Kohlenstoffgerüst hat Ethanol aber auch Ähnlichkeit mit Toluol und ist ebenfalls in jedem Verhältnis mit diesem mischbar.

¹ Maß für die in einem Gramm MCT gebundenen und frei vorkommenden Säuren

Im Gegensatz zum Toluol ist Ethanol zwar nicht als gesundheitsschädlich eingestuft, wird aber pathologisch als obligat hepatotoxischer Stoff angesehen [102, S. 258].

3.1.3.4 Wasser

Wasser wurde in bidestillierter Qualität verwendet, welches regelmäßig mit einer Bidestillationsanlage (Typ 2102, GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland) frisch hergestellt wurde.

Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen in den vier Richtungen eines Tetraeders entstehen starke und gerichtete zwischenmolekulare Kräfte, weshalb Wasser einige Anomalien aufweist und damit rechnerisch aus der homologen Reihe heraussticht. Es gehört zu den ungiftigsten und verträglichsten Lösungsmitteln, weshalb es eine breite Anwendung in der Galenik findet.

3.1.4 Zellkultur

3.1.4.1 Dulbeccos Modified Eagles Medium

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland) wurde nach Dulbecco und Freeman von 1959 benannt. Das Universalmedium entstand aus einer Modifizierung des Basal- bzw. Minimalmediums nach Eagle, wobei mehrere Zusatzkomponenten hinzugefügt wurden. So ist die Pufferkapazität erhöht und eine bis zu vierfache Konzentration von Aminosäuren und Vitaminen im Medium enthalten.

Zusätzlich wurde dem Medium 4 mmol/l L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 100 IU/ml² Penicillin G, 0,1 mg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin B (alle Substanzen von Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) hinzugegeben. Je nach Anforderung wurde bis zu 10 % fetales Kälberserum hinzugefügt.

² IU = Internationale Einheit, welche die Menge Penicillin G beschreibt, die in 50 ml Bouillon das Wachstum eines bestimmten *Staphylococcus aureus* Stammes gerade noch hemmt.

3.1.4.2 Fetales Kälberserum

Das Fetale Kälberserum (fetal calf serum, FCS, Biochrom, Berlin, Deutschland) wird aus dem Blut von Rinderföten gewonnen. Dafür werden trächtige Tiere bei der Schlachtung separiert und der Uterus mitsamt der noch ungeöffneten Fruchtblase entnommen. Das fetale Blut wird durch die Herzpunktion des Fötus abgesaugt, wodurch nach der Aufreinigung etwa 500 ml FCS gewonnen wird. Auf diese Weise werden jährlich ca. eine Million Rinderföten getötet.

FCS ist ein weit verbreitetes Serum, welches das Wachstum von Zellen fördert und die Kulturen mit Hormonen, Wachstums- und Anheftungsfaktoren, Bindungs- und Transportproteinen, Aminosäuren, anorganischen Salzen, Spurenelementen sowie Puffer- und Neutralisationssystemen versorgt. Die genaue Zusammensetzung schwankt relativ stark und ist auch noch weitgehend unbekannt. Es enthält ca. 1800 Serumproteine, wovon bisher 300 identifiziert wurden. BSA ist mit etwa 2,0 bis 3,6 mg/100 ml bei einer Gesamtproteinkonzentration von ca. 3,8 mg/100 ml das Hauptprotein. Die mittlere Albuminkonzentration wird mit 2,3 % angegeben [103, 104].

3.1.4.3 HaCaT-Zellen

Die HaCaT-Zellen (DKFZ, Heidelberg, Deutschland) sind nach ihrer Herkunft aus *Human adult skin keratinocytes propagated under low Ca^{2+} conditions and elevated temperature*, dt. menschliche Hautkeratinozyten unter niedrigen Ca^{2+} -Bedingungen und erhöhter Temperatur, benannt [1]. Die Zellen ermöglichen die Charakterisierung menschlicher Keratinozyten in einem reproduzierbaren Modell. Die spontan transformierte aneuploide immortalisierte Zelllinie besitzt in vitro eine hohe Fähigkeit zur Proliferation und zur Differenzierung.

3.2 Methoden

Der Methodenteil beschreibt alle für die Ergebnisse relevanten Methoden zur Herstellung der unterschiedlichen Arzneistoffträgersysteme und die verwendeten Mess-, Analysen- sowie Auswertemethoden zur Charakterisierung der Formulierungen.

3.2.1 Statistische Auswertung

Für die Beurteilung der statistischen Signifikanz zwischen zwei Datenreihen wurden die folgend beschriebenen statistischen Tests durchgeführt. Diese Tests wurden so ausgelegt, dass auch Datenreihen mit unterschiedlich großem Stichprobenumfang miteinander verglichen werden konnten. Ziel war es zu beurteilen, ob es eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür gibt, dass sich die Datenreihen im Mittelwert \bar{x} und der Standardabweichung s nicht nur zufällig unterscheiden, sondern signifikant voneinander abweichen. Wenn keine Signifikanz vorliegt, dann ist es wahrscheinlich, dass die Datensätze einer gemeinsamen Grundgesamtheit entstammen.

3.2.1.1 Shapiro-Wilk-Test

Voraussetzung für die verwendeten Tests ist, dass die Datenreihen aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen. Dafür wurden diese mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung untersucht. Dieser Test ist auch für kleine Stichproben mit $3 \leq n \leq 50$ geeignet, weshalb er hier verwendet wurde. Durch die Modifikation des Tests ist es aber auch möglich Datenreihen von bis zu 5000 Messwerten zu untersuchen [105]. Wie im Zentralen Grenzwertsatz beschrieben, konvergiert eine hohe Anzahl an Zufallsvariablen gegen die Normalverteilung, weshalb Datenreihen mit einem großen Stichprobenumfang den Shapiro-Wilk-Test mit einer höheren Wahrscheinlichkeit bestehen. Bei dem Test auf Normalverteilung ist jede Datenreihe einzeln zu untersuchen. Die Nullhypothese H_0 besagt, dass die Datenreihe aus einer Grundgesamtheit mit normalverteilten Daten stammt. Sollte die Datenreihe aus keiner normalverteilten Grundgesamtheit stammen, dann ist die Alternativhypothese H_1 erfüllt, was bedeutet, dass für die weitere Beurteilung der statistischen Signifikanz auf verteilungsunab-

hängige Verfahren wie den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test zurückzugreifen ist. Da die erhobenen Messdaten von ihrer Art als Grundgesamtheit allerdings immer einer Normalverteilung entsprachen, war dies nicht notwendig.

Die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art, bei welchem die Nullhypothese H_0 verworfen wird, obwohl sie richtig ist, wird häufig mit 5 % festgelegt. Diese Irrtumswahrscheinlichkeit α kann auf 10 % erhöht werden, wenn der Shapiro-Wilk-Test, wie hier, nur als Vortest verwendet wird, um die Bedingung auf Normalverteilung für einen nachfolgenden Signifikanztest zu überprüfen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α sollte auch nicht zu niedrig gewählt werden, da dadurch die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 2. Art steigt, bei welchem die Nullhypothese H_0 angenommen wird, obwohl diese falsch ist. Die Wahl der Irrtumswahrscheinlichkeit α , die auch Signifikanzniveau genannt wird, ist deshalb relativ willkürlich. Zur Beurteilung von Daten haben sich allerdings bestimmte Irrtumswahrscheinlichkeiten etabliert, die auch im Folgenden verwendet wurden. Bei $\alpha \leq 5\%$ spricht man von signifikanten, bei $\alpha \leq 1\%$ von sehr signifikanten und bei $\alpha \leq 0,1\%$ von hoch signifikanten Unterschieden.

Für die Durchführung des Shapiro-Wilk-Tests wird die zu untersuchende Datenreihe aufsteigend sortiert, wobei x_1 der kleinste Wert und x_n der größte Wert ist. Die Testgröße W_{Test} wird über Gleichung 3.2.1 bestimmt.

$$W_{Test} = \frac{\left(\sum_{i=1}^k a_i \cdot (x_{(n-i+1)} - x_i) \right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}_{arithm})^2} \quad (3.2.1)$$

$$\bar{x}_{arithm} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Bei gerader Stichprobenanzahl n ist $k = \frac{n}{2}$ bei ungerader Stichprobenanzahl n entspricht $k = \frac{n-1}{2}$. Der Faktor a_i ist ein in Statistikbüchern tabellierter Koeffizient für den Shapiro-Wilk-Test und für jede Multiplikation entsprechend dem Index i herauszusuchen. Außerdem ist der Faktor a_i abhängig von dem Wert k . Der Term

$x_{(n-i+1)} - x_i$ beschreibt beispielsweise für den Index $i = 1$ die Subtraktion des letzten Wertes mit dem ersten Wert aus der aufsteigend sortierten Datenreihe. Der ebenfalls tabellierte Schwellenwert W_{Tab} ist abhängig von der Stichprobenanzahl n und der Irrtumswahrscheinlichkeit α . Die Nullhypothese H_0 wird verworfen, wenn $W_{Test} > W_{Tab}$ ist. Wenn W_{Test} kleiner als W_{Tab} ist, dann entstammt die untersuchte Datenreihe wahrscheinlich einer normalverteilten Grundgesamtheit.

3.2.1.2 F-Test

Sollten die beiden zu überprüfenden Datenreihen aus normalverteilten Grundgesamtheiten stammen, dann kann mit einem F-Test untersucht werden, ob sich die Standardabweichungen s der Datenreihen nur zufällig voneinander unterscheiden oder ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Standardabweichungen gibt. Die Nullhypothese H_0 ist mit $\sigma_1 = \sigma_2$ festgelegt (σ : Standardabweichung der Grundgesamtheit), was einem zweiseitigen Test entspricht. Damit wird nur auf einen Unterschied zwischen den Standardabweichungen untersucht und nicht ob eine der Standardabweichungen größer ist als die andere, was einem einseitigen Test entsprechen würde. Die Alternativhypothese H_1 ist entsprechend mit $\sigma_1 \neq \sigma_2$ definiert. Die Testgröße F_{Test} wird nach Gleichung 3.2.2 ermittelt.

$$F_{Test} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \text{ mit } s_1 > s_2 \quad (3.2.2)$$

Durch die Bedingung $s_1 > s_2$ ist die Testgröße F_{Test} immer größer 1. Der Schwellenwert F_{Tab} ist wieder ein tabellarisierter Wert, der abhängig von der Irrtumswahrscheinlichkeit α und den Freiheitsgraden $m = n - 1$ ist. Da es sich um einen zweiseitigen Test handelt, muss der Schwellenwert F_{Tab} mit $F_{m;1-\frac{\alpha}{2}}$ nachgeschlagen werden. Bei $F_{Test} < F_{Tab}$ wird die Nullhypothese H_0 angenommen, womit sich die Datenreihen nur zufällig in ihrer Streuung unterscheiden und eine gleiche Qualität aufweisen.

Für die abschließende Untersuchung der Signifikanz von zwei Stichproben kann nun abhängig vom F-Test der Zwei-Stichproben-t-Test oder der Welch-Test angewen-

det werden. Bei gleicher Varianz bzw. Standardabweichung, also angenommener Nullhypothese H_0 , kann mit dem t-Test weitergerechnet werden. Bei abgelehnter Nullhypothese H_0 und damit ungleicher Varianz bzw. Standardabweichung wird der Welch-Test verwendet.

3.2.1.3 Zwei-Stichproben-t-Test

Wird die Nullhypothese H_0 mit $\mu_1 = \mu_2$ erfüllt (μ : Mittelwert der Grundgesamtheit), dann stammen die berechneten Mittelwerte \bar{x} der beiden Datenreihen wahrscheinlich aus einer Grundgesamtheit und weichen nicht signifikant voneinander ab. Die Testgröße t_{Test} wurde nach der Gleichung 3.2.3 berechnet.

$$t_{Test} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2(n_1 - 1) + s_2^2(n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}}} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (3.2.3)$$

Die Terme \bar{x}_1 und \bar{x}_2 sind die arithmetischen Mittelwerte der beiden Datenreihen und n die Anzahl der Messdaten pro Datenreihe. Die Standardabweichungen gehen mit s in die Gleichung ein. Für den zweiseitigen t-Test wird der tabellierte Schwellenwert t_{Tab} in Abhängigkeit von der Irrtumswahrscheinlichkeit α und den Freiheitsgraden $m = n_1 + n_2 - 2$ nach $t_{m;1-\frac{\alpha}{2}}$ berechnet und herausgesucht. Die Nullhypothese H_0 wird bei $t_{Test} > t_{Tab}$ abgelehnt. Wenn die Testgröße t_{Test} größer als der tabellierte Schwellenwert t_{Tab} ist und die Nullhypothese H_0 damit abgelehnt wird, dann unterscheiden sich die beiden Datenreihen bei gleicher Varianz und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ signifikant voneinander. Die Abweichungen der beiden untersuchten Mittelwerte sind dann wahrscheinlich nicht zufällig.

3.2.1.4 Welch-Test

Sollten die beiden Standardabweichungen der Stichproben im F-Test signifikant voneinander abweichen $F_{Test} > F_{Tab}$, dann wird von ungleichen Varianzen gesprochen und zur Überprüfung der Signifikanz der Mittelwerte der Welch-Test verwendet. Die

Nullhypothese H_0 mit $\mu_1 = \mu_2$ ist identisch zum t-Test, allerdings wird die Testgröße t_{Test} nach der Gleichung 3.2.4 berechnet.

$$t_{Test} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (3.2.4)$$

Die Terme der Gleichung sind im Zwei-Stichproben-t-Test definiert. Zusätzlich ist die Berechnung der Freiheitsgrade f für den Schwellenwert t_{Tab} nach Gleichung 3.2.5 etwas aufwendiger.

$$f = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 - 1}} \quad (3.2.5)$$

Der Freiheitsgrad f wird auf eine ganze Zahl gerundet und kann dann zusammen mit der Irrtumswahrscheinlichkeit α für den tabellierten Schwellenwert des zweiseitigen Welch-Tests $t_{Tab} = t_{f; 1 - \frac{\alpha}{2}}$ verwendet werden. Wie im vorangegangenen Zwei-Stichproben-t-Test wird die Nullhypothese H_0 bei $t_{Test} > t_{Tab}$ abgelehnt. Wenn die Testgröße t_{Test} kleiner als der tabellierte Schwellenwert t_{Tab} ist und die Nullhypothese H_0 damit angenommen wird, dann unterscheiden sich die beiden Datenreihen bei ungleicher Varianz und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 5\%$ nicht signifikant voneinander. Die Abweichungen der beiden untersuchten Mittelwerte sind damit wahrscheinlich zufällig.

3.2.2 Statistische Versuchsplanung

Mit einer statistischen Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) wurden die Prozessparameter für die Herstellung der lipidhaltigen Nanopartikel in der Mikro-

kanalhochdruckemulgieranlage optimiert. In vorangegangenen Arbeiten wurden bestimmte Prozessparameter für eine definierte Partikelgröße bestimmt [106]. Ein tieferes Prozessverständnis, das über die Prinzipien „ein Faktor nach dem anderen“ (one factor at a time) oder dem „Versuch und Irrtum“ (trial and error) hinausgehen, ist nur möglich, wenn die Einzel- und Wechselwirkungen von Einflussfaktoren bekannt sind. Bei dem „ein Faktor nach dem anderen“-Prinzip bleiben beispielsweise bis auf einen alle Faktoren konstant. Dementsprechend beziehen sich alle Variationen auf einen Ausgangspunkt, weshalb unklar bleibt, wie das System reagiert, wenn ein anderer Ausgangspunkt für die festen Faktoren gewählt wird. Durch eine systematische Planung und eine statistische Auswertung von Versuchen ist es mit einem DoE möglich, mit geringem Aufwand diese funktionalen Zusammenhänge von Einflussparametern zu bestimmen und mathematisch zu beschreiben.

Entworfen und berechnet wurde das Design of Experiments (DoE) mit der Software Cornerstone (Version 7.0, CamLine, Petershausen, Deutschland). Die Einflussparameter wurden mit einem Ishikawa-Diagramm ermittelt (siehe Abbildung 4.8, Seite 122). Die daraus gewählten Parameter werden Faktoren genannt und waren der Homogenisierungsdruck (500-1600 bar), die Anzahl der Zyklen (1-5) sowie die Zeitspanne der Voremulgierung (10-120 s). Als optimaler Versuchsplan hat sich der weit verbreitete und oft genutzte, zentral zusammengesetzte Versuchsplan (CCD, Central Composite Design) herausgestellt [107]. Die CCD-Modelle bestehen aus einem 2^k faktoriellen Design und sind mit einem $2k$ Sternpunktversuch kombiniert. Hierbei steht k für die Anzahl der untersuchten Parameter, was bei drei Parametern geometrisch einem Würfel mit einem dreidimensionalen Stern entspricht. Durch die zusätzlichen Versuche (Stern) können im Gegensatz zu einem einfachen zweistufigen Versuchsplan (Würfel) auch nichtlineare Zusammenhänge untersucht werden, was hier für den Homogenisierungsdruck notwendig ist.

Allgemein lassen sich drei CCD-Varianten unterscheiden. Beim Central Composite Circumscribed Design (CCC) bilden die Sternpunkte neue Extremwerte, die außerhalb des definierten Wertebereichs von -1 bis +1 liegen (siehe Abbildung 3.2). Da in diesem Fall schon mit dem zweistufigen Versuchsplan (Würfel) der maximale Arbeitsbereich von 1600 bar erreicht ist, kann ein solches Design hier nicht verwendet werden. Eine

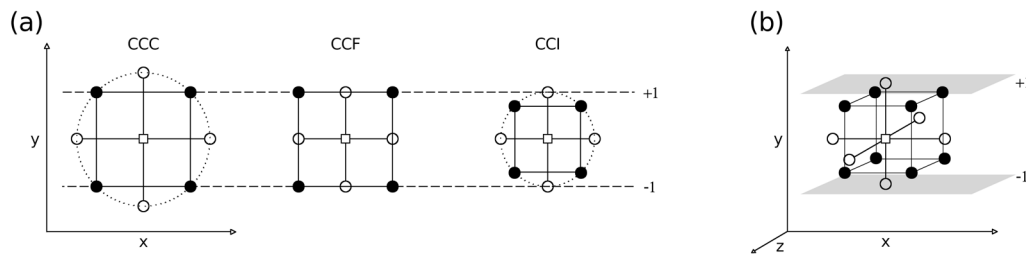


Abbildung 3.2: Teil (a): Zweifaktorielle Darstellung der drei unterschiedlichen Central Composite Designs mit den Wertebereichen der Ordinatenachse von +1 bis -1. Teil (b): Dreifaktorielle Darstellung am Beispiel des Central Composite Inscribed Designs (CCI), in grau der Wertebereich für zwei der 6 Grenzflächen.

Alternative ist deshalb das Central Composite Face-Centered Design (CCF). Hier werden die axialen Sternpunkte auf die Würfelflächen projiziert. Dieses Design hat allerdings den Nachteil, dass die quadratischen Effekte untereinander korrelieren [108]. Eine bessere Alternative ist das hier verwendete Central Composite Inscribed Design (CCI). Dabei entsprechen die Sternpunkte ebenfalls den Abmessungen des Würfels und damit den Grenzen des Wertebereichs. Gleichzeitig wird aber wie in Abbildungsteil 3.2 a dargestellt, die Größe des Würfels äquivalent zu den Sternpunkten reduziert [109–111].

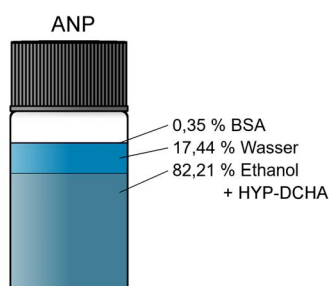
Einer der Gründe für die Beliebtheit der CCD-Varianten ist der geringe Versuchsumfang. Dementsprechend besteht der Versuchsplan bei drei Faktoren aus nur 15 Versuchen. Zuerst wird der Zentralpunkt getestet und danach folgen Variationen für jeweils einen Faktor, die auf insgesamt 5 Stufen untersucht werden. Für das hier verwendete DoE lag der Zentralpunkt bei einem Homogenisierungsdruck von 1050 bar, einer Zyklenanzahl von 3 und einer Zeitspanne für die Voremulgierung von 65 s. Die Stufen des Homogenisierungsdrucks lagen bei 500, 723, 1050, 1377 und 1600 bar. Die einzelnen Stufen der Zyklenanzahl waren 1, 2, 3, 4 und 5 Zyklen und die Stufen der Voremulgierungszeit entsprachen 10, 32, 65, 98 und 120 s. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte automatisch mit der Software Cornerstone. Berechnungen darüber hinaus sind im Ergebnisteil ab Kapitel 4.3.1 dargestellt.

3.2.3 Herstellungsmethoden

Die Herstellungsmethoden sind in zwei größere Kapitel gegliedert und beschreiben zuerst die Vorgehensweise zur Herstellung der Albumin-Nanopartikel mit den unterschiedlichen Beladungszeitpunkten. Das zweite Kapitel beschreibt ab Seite 55 die Herstellung der beiden untersuchten lipidbasierten Nanopartikelformulierungen. Hierbei werden zwei Beladungsmethoden unterschieden.

3.2.3.1 Herstellung der Albumin-Nanopartikel

Für die Herstellung der Albumin-Nanopartikel (ANP) wurde die Desolvationsmethode mit anschließender thermischer Quervernetzung verwendet [84]. Im Abbildungsteil 3.3 (a) sind die prozentual gewichteten Bestandteile der ANP-Formulierung dargestellt. Im Abbildungsteils 3.3 (b) ist der instrumentelle Aufbau für die Albumin-Nanopartikel-Herstellung abgebildet.



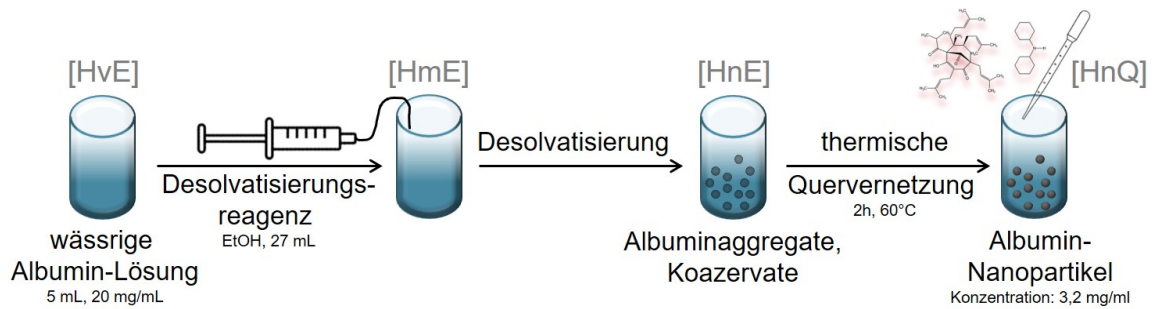
(a) Bestandteile der ANP-Formulierung. (b) Der Aufbau für die ANP-Herstellung.

Abbildung 3.3: Abbildungsteil (a): prozentual gewichtete Bestandteile der ANP-Formulierung. Abbildungsteil (b): im Hintergrund die Spritzenpumpe für das Desolvationsreagenz Ethanol, in der Mitte der verwendete Rührer, im Vordergrund das Wasserbad für die thermische Quervernetzung.

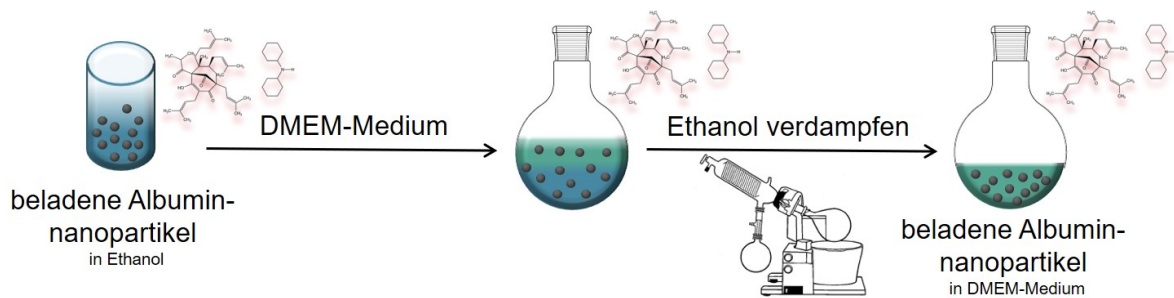
Das Setup für die ANP besteht im Wesentlichen aus zwei Magnetrührern (RH basic 2 und RCT basic, beide IKA, Staufen, Deutschland) und einer Spritzenpumpe (KDS-

3 Material und Methoden

270-CE, KD Scientific, Holliston, USA) mit Glasspritze (FORTUNA OPTIMA 50 mL, Poulten & Graf. Wertheim, Deutschland).



(a) Herstellungsschritte für die ANP mit den unterschiedlichen HYP-DCHA-Beladungszeitpunkten, hier exemplarisch für den Beladungszeitpunkt [HnQ] (vergleiche Tabelle 3.2).



(b) Austausch der ethanolischen äußeren Phase am Beispiel von DMEM.

Abbildung 3.4: Die einzelnen Prozessschritte zur Herstellung von Albumin-Nanopartikeln mit anschließendem Phasenaustausch.

Die einzelnen Herstellungsschritte sind dem Abbildungsteil 3.4 (a) zu entnehmen. Für die ANP-Herstellung werden 100 mg Bovines Serumalbumin (BSA) in 5 ml bi-destilliertem Wasser gelöst und eine Minute auf dem ersten Magnetprüher bei 500 rpm in einem Becherglas gerührt. Mit einer Spritzenpumpe werden in diese BSA-Lösung innerhalb von 2 Minuten 27 ml des Desolvatationsreagenzes Ethanol kontinuierlich durch eine Injektionsnadel (0,55 x 0,25 mm, Gr.17, 24Gx1, B. Braun, Melsungen, Deutschland) und unter ständigem Rühren bei 500 rpm gepumpt. Die Mischung wird im Anschluss für weitere 10 Minuten bei 500 rpm gerührt. Auf dem zweiten Magnetprüher wurde parallel ein Wasserbad auf 60 °C temperiert. Durch den

Temperaturanstieg auf 60 °C wird die Quervernetzung eingeleitet. Das Becherglas mit der hergestellten Mischung verbleibt für 2 Stunden unter ständigem Rühren bei 500 rpm im Wasserbad bei 60 °C.

Nach der Herstellung der Albumin-Nanopartikel wurde die ethanolische äußere Phase, wie in Abbildungsteil 3.4 (b) verdeutlicht, vollständig durch eine wässrige Phase mit 0,27 mol/l Trehalose (D(+)-Trehalose Dihydrat, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) oder mit dem Zellkulturmedium Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) und ggf. weiteren Zusätzen (siehe Kapitel 3.1.4) ersetzt. Im nächsten Kapitel werden die unterschiedlichen Beladungszeitpunkte beschrieben.

3.2.3.2 Beladungszeitpunkte der Albumin-Nanopartikel

Es wurden vier unterschiedliche Beladungsmethoden untersucht, die in Tabelle 3.2 mit ihren Kürzeln aufgelistet und im Abbildungsteil 3.4 (a) dargestellt sind. Für die Beladungen wurden jeweils 3 ml einer ethanolischen HYP-DCHA-Stammlösung verwendet, womit für die Herstellung der ANP insgesamt 30 ml Ethanol verwendet wurden.

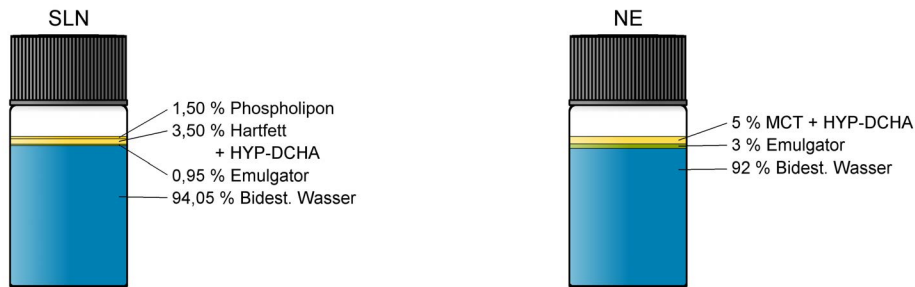
Abkürzung	Beschreibung der Abkürzung
[HvE]	HYP-DCHA vor dem Desolvatationsreagenz
[HmE]	HYP-DCHA zeitgleich mit dem Desolvatationsreagenz
[HnE]	HYP-DCHA nach dem Desolvatationsreagenz
[HnQ]	HYP-DCHA nach der Quervernetzung

Tabelle 3.2: Beladungszeitpunkte im Bezug auf das Desolvatationsreagenz Ethanol (siehe Abbildungsteil 3.4 (a)).

3.2.3.3 Herstellung von lipidbasierten Nanopartikeln

Mit den lipidbasierten Nanopartikeln werden gänzlich andere Arzneistoffträgersysteme untersucht, die sich in der gesamten Herstellung und der Zusammensetzung von Albumin-Nanopartikeln unterscheiden. Verwendet wurden Suspensionen und Emulsionen nanoskaliger Partikel bzw. Tröpfchen, im Weiteren als Lipidnanosuspensionen

bzw. SLN-Formulierungen (solid lipid nanoparticles, SLN) und als Nanoemulsionen (NE) bzw. NE-Formulierungen bezeichnet.



(a) Prozentual gewichtete Bestandteile der SLN-Formulierung. (b) Prozentual gewichtete Bestandteile der NE-Formulierung.

Abbildung 3.5: Prozentual gewichtete Bestandteile der lipidbasierten Nanopartikel.

Die Herstellung der SLN-Formulierungen unterscheidet sich hauptsächlich in der Verarbeitungstemperatur bei der Dispergierung von den Nanoemulsionen. Aufgrund des bei Raumtemperatur festen Hartfetts Softisan[®] HS154 werden die SLN-Formulierungen bei 70 °C hergestellt. Die in der NE-Formulierung verwendeten mittelkettigen Triglyceride Miglyol[®] 812 sind bei Raumtemperatur flüssig, weshalb die Dispergierung bei Raumtemperatur durchgeführt wird. Die Formulierungsbestandteile sind in ihrer anteiligen Zusammensetzung grafisch aufbereitet in Abbildung 3.5 dargestellt.

Die Dispergierung erfolgt in zwei Schritten. Die Vordispergierung wird mit einem Hand-Dispergiergerät (UltraTurrax T25 digital mit Dispergierwerkzeug S 25 N-10 G, IKA-Werke, Staufen, Deutschland) bei 12 000 rpm durchgeführt und die Feindispergierung mit einer Mikrokanalhochdruckemulgieranlage siehe Abbildungsteil 3.6 (e), die im DFG-Forschungsprojekt mikroPART entwickelt wurde [106].

3.2.3.3.1 Feste Lipidnanopartikel

Zur Herstellung der SLN-Formulierung wird zuerst die Lipidphase aus Tabelle 3.3 hergestellt. Dafür werden die Lipidbestandteile bei 90 °C unter Rühren aufgeschmol-

zen (siehe Abbildungsteil 3.6 (a) und (b)) [112], wodurch sich das Phospholipon® 90 G im Softisan® HS154 löst. Für die direkte Beladung wird der Wirkstoff HYP-DCHA bei 70 °C unter Rühren in die aufgeschmolzene Formulierung eingearbeitet. Nach dem Erstarren bei Raumtemperatur wird die Lipidphase als Lipidmatrix bezeichnet.

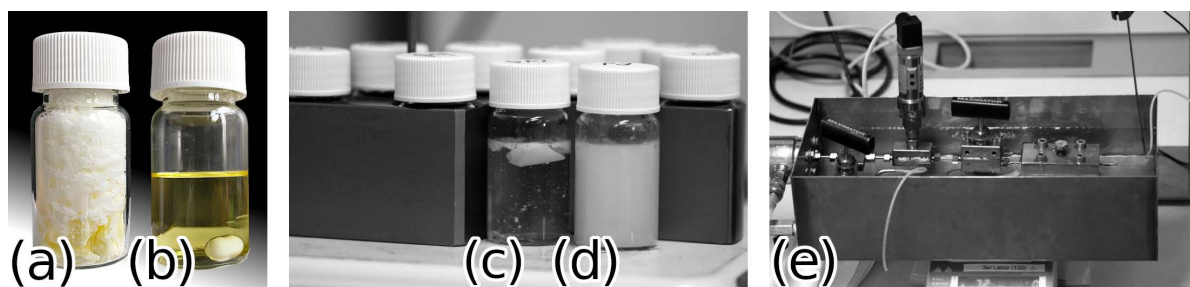


Abbildung 3.6: Prozessschritte für die SLN-Herstellung: In (a) sind die festen Bestandteile der Lipidmatrix dargestellt, die in (b) bei 70 °C aufgeschmolzen sind. In (c) ist die SLN-Formulierung mit der ungeschmolzenen Lipidmatrix und in (d) die SLN-Formulierung als Voremulsion abgebildet. In (e) ist die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage dargestellt.

Im nächsten Schritt wird die erstarrte Lipidmatrix zusammen mit der wässrigen Phase eingewogen und das Gemisch erneut auf 70 °C temperiert (siehe Abbildungsteil 3.6 (c)). Je nach gewünschter äußerer Phase werden der wässrigen Phase neben dem Emulgator auch noch BSA oder die für die Zellkultur benötigten Additive zugesetzt (siehe Tabelle 3.3). Durch anschließendes Voremulgieren mit dem Hand-Dispergiergerät für 10 s entsteht die in Abbildungsteil 3.6 (d) gezeigte Voremulsion. Diese wird, wie in Kapitel 3.2.3.3.3 beschrieben, durch Hochdruckhomogenisation mit der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage zur fertigen Formulierung weiterverarbeitet (siehe Abbildungsteil 3.6 (e)).

Wichtig bei der Weiterverarbeitung ist die konstante Temperatur von 70 °C in allen weiteren Prozessschritten, damit die Lipidmatrix nicht erstarrt und den Mikrokanal der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage verstopft. Wie dem Abbildungsteil 3.6 (e) zu entnehmen ist, wird dafür die gesamte Anlage bei 70 °C temperiert.

Phase	Formulierungs- anteil in %	Bestandteil	Massen- anteil in %	Masse in g
Lipidphase	5	Softisan [®] HS154	70	0,525
		Phospholipon [®] 90 G	30	0,225
Wässrige Phase I ohne BSA	95	Solutol [®] HS15	1	0,143
		Aqua Bidest	99	14,108
Wässrige Phase II mit 1 % BSA	95	Solutol [®] HS15	1	0,143
		BSA	1	0,143
		Aqua Bidest	98	13,965
Wässrige Phase III aus DMEM	95	Solutol [®] HS15	1	0,143
		DMEM + 10 % FCS	99	14,108

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der SLN-Formulierungen mit den drei unterschiedlichen wässrigen Phasen. Die Einwaage einer Lipidphase zusammen mit einer der drei wässrigen Phasen ergibt die Probenmasse von 15 g (Absoluteinwaagen in der letzten Spalte).

3.2.3.3.2 Nanoemulsionen

Für die Herstellung von unbeladenen NE-Formulierungen wird die Lipidphase zusammen mit einer der drei wässrigen Phasen gemäß Tabelle 3.4 eingewogen (vergleiche Abbildung 3.7) und mit dem Hand-Dispergiergerät für 10 s voremulgiert.



Abbildung 3.7: NE-Formulierungen vor (links) und nach der Homogenisierung mit der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage (rechts).

Phase	Formulierungs- anteil in %	Bestandteil	Massen- anteil in %	Masse in g
Lipidphase	5	Miglyol® 812	100	0,75
Wässrige Phase I ohne BSA	95	Solutol® HS15 Aqua Bidest	3 97	0,45 13,80
Wässrige Phase II mit 1 % BSA	95	Solutol® HS15 BSA Aqua Bidest	3 1 96	0,45 0,15 13,65
Wässrige Phase III aus DMEM	95	Solutol® HS15 DMEM + 10 % FCS	3 97	0,45 13,80

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der NE-Formulierungen. Die Massen in der letzten Spalte ergeben die Einwaagen für eine 15 g Probe (Lipidphase und eine der drei wässrigen Phasen).

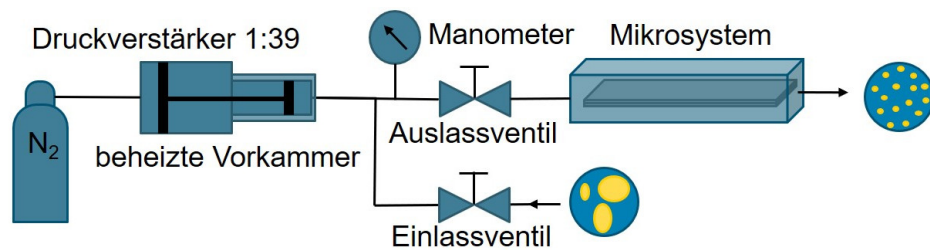
Bei der Produktion der beladenen Formulierungen wird zuerst das MCT (Miglyol® 812) vorgelegt und anschließend der feste Wirkstoff HYP-DCHA durch Rühren darin gelöst. Hiernach wird die wässrige Phase zugesetzt und die Formulierung mit dem Hand-Dispergiergerät voremulgiert.

Das nächste Kapitel 3.2.3.3.3 beschreibt die Feindispergierung der Voremulsion mit der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage. Aufgrund des bei Raumtemperatur flüssigen Lipids der Nanoemulsionen kann die Anlage dabei im Vergleich zu den SLN-Formulierungen ohne Wasserbad bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) betrieben werden.

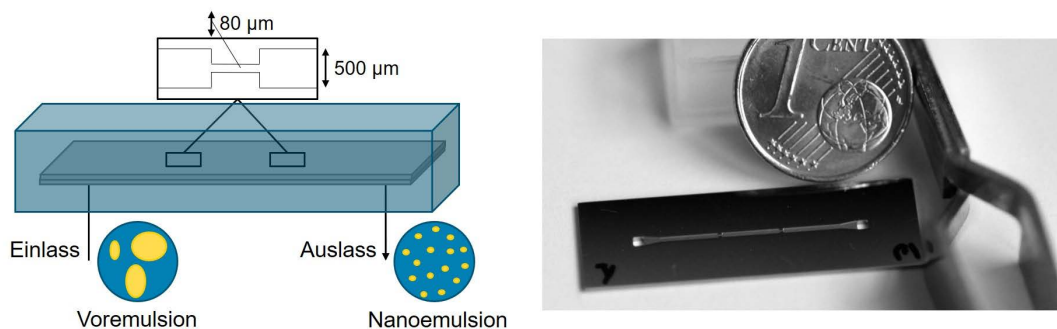
3.2.3.3.3 Hochdruckhomogenisation

Die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage in Abbildungsteil 3.8 (a) besteht aus einem Druckverstärker, der den angelegten Druck um den Faktor 39 erhöht, einer beheizten Vorkammer, einem Einlass- und einem Auslassventil, einem Manometer sowie dem Mikrosystem, in dem die Feindispergierung stattfindet. Mit dem Druckverstärker wird ein Unterdruck erzeugt, wodurch die Voremulsion über das Einlassventil in die beheizte Vorkammer gesaugt wird. Im Folgenden wird mit einer CO₂-Gasflasche ein Überdruck auf den Druckverstärker angelegt, dadurch wird die Voremulsion nach

dem Öffnen des Auslassventils mit bis zu 1600 bar durch den Mikrokanal gedrückt. Die durch die Querschnittsverengung im Mikrokanal entstehende laminare Dehnströmung, die Zähigkeits- und Trägheitskräfte in turbulenter Strömung sowie die Kavitations- und Scherkräfte verkleinern die innere Phase. Dieser Vorgang wird pro Formulierung dreimal wiederholt. Die Anlage nimmt ein Probenvolumen von 15 ml auf. Dieses Volumen ist nicht variierbar und damit bei allen Proben gleich.



(a) Schematischer Aufbau der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage.



(b) links: Schematische Darstellung des Mikrokanals mit Gehäuse,
rechts: Größenvergleich des Mikrokanals mit einer 1-Cent-Münze.

Abbildung 3.8: Schematische Darstellungen der
Mikrokanalhochdruckemulgieranlage und des Mikrokanals.

Der Mikrokanal in Abbildung 3.8 (b) ist 500 µm breit und besteht aus zwei Engstellen mit einem Durchmesser von jeweils 80 µm. Die Kanaltiefe beträgt 55 µm. Die Querschnittsfläche der Engstelle ist somit 0,004 mm² groß.

Das Material der Mikrokanäle besteht aus X10CrNi18-8, einem austenitischen Chrom-Nickel-Stahl, der nach DIN EN 10088 mit der Werkstoffnummer 1.4310 gelistet

ist. Der hochlegierte Stahl hat demnach einen Anteil von ca. 0,10 % Kohlenstoff (C), 0,18 % Chrom (Cr) und 0,80 % Nickel (Ni). Aufgrund der Korrosionsbeständigkeit eignet sich der Stahl gut für hohe mechanische Anforderungen und lässt sich bei Temperaturen bis zu 300 °C verwenden. Er wird hauptsächlich für die Federproduktion verwendet, findet aber auch in vielen anderen Branchen Anwendung. Hergestellt wurden die Kanäle durch Mikro-Funkenerodieren (μ EDM, engl. micro electrical discharge machining) in Kombination mit einem Elektropolier-Verfahren [113]. Die Geometrie und das Material des Kanals kann prinzipiell auch variiert werden, allerdings haben Finke et. al. [106] den hier verwendeten Typ zur Dispergierung von SLN- und NE-Formulierungen als am effektivsten beurteilt.

3.2.3.3.4 Passive Beladung

Für die passive Beladung wird ein adäquates Volumen an ethanolischer HYP-DCHA-Stammlösung von 0,5 ml mit 40 μ mol/l HYP-DCHA (siehe Gleichung 3.2.9, Seite 64) in einen Rundkolben vorgelegt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 85 mbar Unterdruck verdampft. Der Druck wurde mit der Antoine-Gleichung und den dafür benötigten Parametern aus der Dortmunder Datenbank (DDB) berechnet. Theoretisch ergibt sich somit für Ethanol ein Dampfdruck von 178 mbar. Experimentell hat sich aufgrund von Temperaturschwankungen und Falschlufte ein niedrigerer Druck von 85 mbar als praktikabel erwiesen. Nach dem Verdampfen des Ethanols bleibt ein dünner Film aus Hyperforinkristallen an der Kolbeninnenseite zurück.

Zum passiven Beladen der Arzneistoffträgersysteme werden 2 ml der unbeladenen Systeme für eine definierte Zeit, in der Regel 10 min, bei 100 rpm im Kolben rotiert. Nach dem Entfernen der passiv beladenen Arzneistoffträgersysteme kann der Kolben zur Kontrolle mit 1 ml Ethanol ausgespült werden, um die im Kolben zurückgebliebene HYP-DCHA-Menge zu bestimmen. Da das Volumen der eingesetzten Arzneistoffträgersysteme größer ist als das der eingedampften ethanolischen Hyperforin-DCHA-Lösung, ist sichergestellt, dass die unbeladenen Arzneistoffträgersysteme die gesamte mit HYP-DCHA-Kristallen besetzte Kolbeninnenseite benetzen.

3.2.3.3.5 Berechnung der HYP-DCHA-Einwaagen

Die Berechnung der HYP-DCHA-Einwaagen unterscheidet sich von der Beladungsmethode. Bei der direkten Beladung wird das HYP-DCHA direkt in die Lipidphase eingearbeitet, während bei der passiven Beladung die Beladung mit einer Stammlösung und der Kolbenmethode erfolgt.

Direkte Beladung

Für die direkte Beladung von 15 ml einer lipidbasierten Nanopartikel-Formulierung (LNP) mit 10 µmol/l HYP-DCHA wird in die Lipidphase der SLN- oder NE-Formulierung 107,72 µg HYP-DCHA-Pulver eingearbeitet. Die Berechnung der HYP-DCHA-Masse erfolgt nach Gleichung 3.2.6, die sich nach Umstellen aus der Gleichung für die Stoffmengenkonzentration

$$c_{\text{HYP-DCHA}} = \frac{n_{\text{HYP-DCHA}}}{V_{\text{ges}}} \rightarrow n_{\text{HYP-DCHA}} = c_{\text{HYP-DCHA}} \cdot V_{\text{ges}}$$

und dem anschließenden Einsetzen der Stoffmengengleichung

$$n_{\text{HYP-DCHA}} = \frac{m_{\text{HYP-DCHA}}}{M_{\text{HYP-DCHA}}}$$

ergibt.

$$\begin{aligned} m_{\text{HYP-DCHA}} &= c_{\text{HYP-DCHA}} \cdot V_{\text{ges}} \cdot M_{\text{HYP-DCHA}} & (3.2.6) \\ &= 10 \mu\text{mol/l} \cdot 15 \text{ ml} \cdot \frac{11}{1000 \text{ ml}} \cdot 718,12 \mu\text{g}/\mu\text{mol} \\ &= 107,7 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Passive Beladung

Für die nachträgliche Beladung der lipidbasierten Nanopartikel-Formulierung (LNP) mit 10 µmol/l HYP-DCHA wird eine ethanolische Stammlösung mit 40 µmol/l HYP-DCHA hergestellt, wovon pro lipidbasierter Nanopartikel-Formulierung 0,5 ml benö-

tigt werden. Die Berechnung erfolgte in zwei Teilen. Im Ersten wird die Konzentration für die ethanolische Stammlösung berechnet. Dies erfolgt mit dem Massenerhaltungssatz.

$$c_{ges} \cdot V_{ges} = c_{HYP-DCHA} \cdot V_{HYP-DCHA} + c_{LNP} \cdot V_{LNP}$$

Das Volumen $V_{HYP-DCHA}$ verdunstet im Rotationsverdampfer, weshalb $V_{ges} = V_{LNP}$ ist. Da in den unbeladenen lipidbasierten Nanopartikeln kein HYP-DCHA enthalten ist, entspricht die HYP-DCHA-Konzentration $c_{LNP} = 0 \mu\text{mol/l}$, wodurch der gesamte Term null wird und sich nach Umstellen die Gleichung 3.2.7 ergibt.

$$c_{HYP-DCHA} = \frac{c_{ges} \cdot V_{LNP}}{V_{HYP-DCHA}} \quad (3.2.7)$$

Im zweiten Teil wird die HYP-DCHA-Einwaage für die ethanolische Stammlösung berechnet. Dies erfolgt simultan zur Berechnung der HYP-DCHA-Einwaage für die direkte Beladung. Es wird wieder die Gleichung für die Stoffmengenkonzentration umgestellt,

$$c_{HYP-DCHA} = \frac{n_{HYP-DCHA}}{V_{EtOH}} \rightarrow n_{HYP-DCHA} = c_{HYP-DCHA} \cdot V_{EtOH}$$

in die Stoffmengengleichung eingesetzt,

$$n_{HYP-DCHA} = \frac{m_{HYP-DCHA}}{M_{HYP-DCHA}}$$

sodass sich Gleichung 3.2.8 ergibt.

$$m_{HYP-DCHA} = c_{HYP-DCHA} \cdot V_{EtOH} \cdot M_{HYP-DCHA} \quad (3.2.8)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 3.2.7 in Gleichung 3.2.8 lässt sich die Einwaage von HYP-DCHA ($m_{HYP-DCHA}$) für beispielsweise 10 ml HYP-DCHA-Stammlösung berechnen.

$$\begin{aligned} m_{\text{HYP-DCHA}} &= \frac{c_{\text{ges}} \cdot V_{\text{ges}}}{V_{\text{HYP-DCHA}}} \cdot V_{\text{EtOH}} \cdot M_{\text{HYP-DCHA}} & (3.2.9) \\ &= \frac{10 \mu\text{mol/l} \cdot 2 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}} \cdot 10 \text{ ml} \cdot \frac{11}{1000 \text{ ml}} \cdot 718,12 \mu\text{g}/\mu\text{mol} \\ &= 287,25 \mu\text{g HYP-DCHA auf 10 ml Ethanol} \end{aligned}$$

3.2.4 Analysemethoden

Bei den verwendeten Analysemethoden wird zuerst theoretisch in die jeweilige Methode eingeleitet und danach der konkrete instrumentelle Aufbau beschrieben.

3.2.4.1 Identifikation von HYP-DCHA-Abbauprodukten

Die Elektrospray-Ionisation mit anschließender Massenspektrometrie (ESI-MS) ermöglicht die Identifikation von Abbauprodukten des Hyperforins. Dafür werden die Moleküle ionisiert, wodurch geladene Teilchen entstehen, die anschließend durch ein elektrisches Feld beschleunigt werden können. Die Bewegungsenergie E_{kin} der beschleunigten Teilchen hängt von der Ladungszahl z und der Spannung U des elektrischen Feldes ab.

$$E_{\text{kin}} = U \cdot z$$

Da die Energie E_{kin} auch immer in Bezug zur Masse m und der Geschwindigkeit v steht,

$$E_{\text{kin}} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2$$

lässt sich durch das Gleichsetzen der beiden Gleichungen die Gleichung 3.2.10 formulieren.

$$U \cdot z = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 \quad (3.2.10)$$

Außerdem ist die Spannung U im elektrischen Feld konstant, weshalb die Teilchen gleichmäßig beschleunigt werden. Je nach Ladungszahl z und Masse m variieren sie allerdings in ihrer Geschwindigkeit. Im folgenden Analysator werden die einzelnen Teilchen von einem Magnetfeld abgelenkt. Durch die Bewegungsenergie E_{kin} wirkt im Magnetfeld die Lorentz-Kraft $F_{Lorentz}$ auf die geladenen Teilchen,

$$F_{Lorentz} = B \cdot z \cdot v$$

weshalb diese abhängig von der magnetischen Feldstärke B und der Geschwindigkeit v von ihrer gradlinigen Flugbahn abgelenkt werden. Die dadurch beschriebene Kreisbahn mit dem Radius r , wird durch die Zentrifugalkraft F_Z begrenzt.

$$F_Z = \frac{m \cdot v^2}{r}$$

Durch das Gleichsetzen der Lorentz-Kraft $F_{Lorentz}$ mit der Zentrifugalkraft F_Z lässt sich in Gleichung 3.2.11 der Radius r der Teilchen berechnen.

$$F_{Lorentz} = F_Z$$

$$r = \frac{m \cdot v}{z \cdot B} \quad (3.2.11)$$

Je leichter die Teilchen sind und umso größer die Ladungszahl z ist, desto stärker ist die Flugbahn gekrümmt. Diese Eigenschaften ermöglichen es, die Teilchen an der Rückseite des Analysators nach Masse und Ladung aufzutrennen. Da der Radius r auch von der unbekannten Geschwindigkeit v und damit von der Beschleunigungsspannung U abhängt, lässt sich der Ablenkungsradius im Magnetfeld des Analysators durch Umstellen von Gleichung 3.2.11 nach v und Einsetzen in Gleichung 3.2.10 berechnen. Die resultierende Gleichung 3.2.12 ist die Grundgleichung der Massenspektrometrie.

$$U \cdot z = \frac{1}{2} \cdot m \cdot \left(\frac{r \cdot z \cdot B}{m} \right)^2$$
$$\frac{m}{z} = \frac{r^2 \cdot B^2}{2U} \quad (3.2.12)$$

Die Massenzahl $\frac{m}{z}$ hat mit der Masse m des Teilchens die Einheit u oder Dalton. Die Anzahl der Teilchen, die einer Massenzahl entsprechen, werden in ihrer Intensität mit der Einheit Counts per second (dt. Zählschritte oder Zählimpulse pro Sekunde) angegeben. Da die Teilchen bei der Messung in Fragmente zerfallen, die in der Regel nur einfach geladen sind, entspricht die Massenzahl $\frac{m}{z}$ oft der Masse des Fragments.

Die schonende Ionisierung der Probe erfolgte durch die Elektrospray-Ionisation (ESI) Turbo V (AB Sciex, Ontario, Canada), wodurch Quasimolekül-Ionen durch die Anlagerung von Wasserstoff $[M + H]^+$ oder Addukt-Ionen mit Bestandteilen des Eluenten wie Natrium $[M + Na]^+$ entstanden. Die ESI war bei einer Flussrate von 5 µl/min mit einem 3200 QTRAP-Massenspektrometer (AB Sciex) gekoppelt. Die Kollisionsenergie lag bei 10 bis 20 eV. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der Software Analyst in der Version 1.6.2 (AB Sciex).

3.2.4.2 Schmelzpunktbestimmungen

Für die Schmelzpunktbestimmungen der einzelnen Formulierungsbestandteile wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

3.2.4.2.1 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die dynamische Differenzkalorimetrie (engl. differential scanning calorimetry, DSC) ist ein Verfahren der thermischen Analyse, bei der durch das Aufheizen oder Abkühlen einer Probe die dabei von der Probe aufgenommene bzw. abgegebene Wärmemenge gemessen wird. Mit der DSC können die Schmelz- und Glasübergangstemperaturen, der Kristallisationsgrad, die kinetische Betrachtung chemischer Reaktionen, die spezifische Wärmekapazität, verschiedene Phasenübergänge, der Zersetzungspunkt oder

die Reinheit einer Substanz bestimmt werden. Bei der Reinheitsbestimmung geschieht dies beispielsweise über die Messung des Schmelzpunktes.

Für die Messung werden zwei Tiegel benötigt. Der eine enthält 5 bis 40 mg der Probe, während der andere leer bleibt und als Referenz dient. Beide Tiegel durchlaufen ein identisches Temperaturprogramm. Durch eine Phasenänderung, wie zum Beispiel das Schmelzen oder Verdampfen der Probe, kommt es zu einer messbaren Temperaturdifferenz zwischen Proben- und Referenztiegel.

Verwendet wurde das dynamische Differenzkalorimeter DSC 1 (Mettler Toledo, Columbus, Vereinigte Staaten) mit einem Temperaturprogramm von 25 bis 110 bzw. 210 °C und einer Heizrate von 10 K/min. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software STARE in der Version 13.00.

3.2.4.2.2 Mikroskop mit Heiztisch

Die zweite Methode zur Schmelzpunktbestimmung ist die optische Bestimmung der Temperatur, bei der die Probe schmilzt. Dafür werden einzelne Kristalle bzw. eine möglichst dünne Schicht der Probe auf einen Objektträger gelegt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die so präparierte Probe wird in die Heizplatte (FP82HT Hot Stage, Mettler Toledo, Columbus, Vereinigte Staaten) gesteckt und unter dem Polarisationsmikroskop mit Lambda-Plättchen (020-520.007 DM/LP, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) ausgerichtet. Über die Steuereinheit (FP90 Central Processor, Mettler Toledo) der Heizplatte werden die Temperaturprogramme eingestellt. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur wurde die Probe mit einer Heizrate von 2 K/min erhitzt. Die optische Auswertung und Dokumentation erfolgte über eine Kamera (MC170 HD, Leica) und der Software Leica Application Suite X (vers. 3.4.2.18368).

3.2.4.3 Bestimmung des pH-Wertes

Zur Bestimmung des negativen dekadischen Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration wurde das pH-Meter FiveEasyTM FE20 (Mettler Toledo, Schwarzenbach, Schweiz) verwendet. Zum Einsatz kam die pH-Elektrode InLab-SemiMicro für partikelhaltige Proben von mindestens 100 µl Probenvolumen und für partikelfreie Proben

die pH-Elektrode InLab-Micro (beide Mettler Toledo), die nur ein Probenvolumen von 45 µl benötigt.

3.2.4.4 Partikel- bzw. Tröpfchengrößenanalyse

Die Bestimmung der Partikel- bzw. Tröpfchengrößen in den Formulierungen erfolgte simultan mit unterschiedlichen Verfahren, um Fehlern bei den Messungen vorzubeugen.

3.2.4.4.1 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS), früher auch Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) genannt, werden die Intensitätsschwankungen des Streulichts einer Dispersion gemessen und daraus indirekt die Partikelgröße berechnet.

Aufgrund von Wärmeeinwirkung (25 °C) kommt es im Dispersionsmedium zu einer ungeordneten Bewegung der einzelnen Moleküle (Brown'sche Molekularbewegung). Wenn Partikel mit diesen Molekülen des Dispersionsmediums kollidieren, wird eine kinetische Energie auf die Partikel übertragen, die zu einer Bewegung (= Diffusion) der Partikel im Dispersionsmedium führt. Je nach Partikelgröße bewegen sich die Partikel unterschiedlich schnell. Große Partikel bewegen sich langsamer als kleine, was zu unterschiedlich schnellen Intensitätsschwankungen des Streulichts führt.

Aus den Intensitätsschwankungen des Streulichts lässt sich die Partikelgeschwindigkeit (= Diffusionsgeschwindigkeit) berechnen, woraus sich die Diffusionskonstante D ableiten lässt. Diese ist mit der Stokes-Einstein-Gleichung 3.2.13 in den Partikelradius r umrechenbar.

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \rightarrow r = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot D} \quad (3.2.13)$$

Der Term k_B steht für die Boltzmann-Konstante, die dynamische Viskosität ist mit η angegeben und T steht für die absolute Temperatur; bei 25 °C also 298,15 K.

Mit den Radien der gemessenen Partikel lässt sich das Z-Mittel (Z-Average) bestimmen. Dieses ist definiert als harmonischer, intensitätsgemittelter Partikeldurchmesser, welcher den zentralen Wert der zugrundeliegenden Partikelgrößenverteilung wider-

spiegelt. Das Z-Mittel hängt von der Viskosität, der Partikelform und dem Streuvektor und damit vom Betrachtungswinkel, der Laserwellenlänge und dem Brechungsindex des Dispersionsmediums ab [114].

Neben dem Z-Mittel ist der Polydispersitätsindex (PDI) ein weiterer wichtiger Parameter für die Beurteilung der Messergebnisse, da er als dimensionslose Größe die Breite der Größenverteilung angibt. Der PDI wird aus der Kumulanzanalyse berechnet und ist ein Wert zwischen 0 und 1. Für einen monodispersen Prüfkörper aus kugelförmigen Partikeln hat der PDI laut DIN ISO 22412 typischerweise Werte unter 0,07 [114]. Nach Stetefeld et al. entsprechen PDI-Werte von $> 0,7$ für eine breite Verteilung, weshalb auch eine nicht-monomodale Verteilungsmethode für die Datenanalyse in Betracht gezogen werden sollte [115]. In der Praxis weisen schon Werte von über 0,2 auf eine nicht-monomodale Verteilung hin.

Das verwendete PCS-Messgerät Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcesstershire, England) hat einen Erfassungswinkel von 173° (Nichtinvasive Rückstreuung, non-invasive back-scatter, NIBS), wodurch die Probe oft unverdünnt gemessen werden kann. Außerdem wird die Intensität des Laserstrahls automatisch über ein Dämpfungsglied (Attenuator) an die Probenbeschaffenheit (Partikelkonzentration) angepasst.

Alle Messungen wurden bei 25°C durchgeführt. Die jeweiligen physikalischen Probenparameter wie Brechungsindex, Viskosität und Dichte der äußeren Phasen für die Berechnung der Partikelgröße in der Zetasizer-Software (Version 7.11) sind der Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Äußere Phase	Dichte in g/ml	Viskosität in mPas	Brechungsindex n_D^{20}
Ethanol + H ₂ O	0,8324	1,7586	1,3629
Trehalose-lsg.	1,0330	1,2544	1,3461
Medium DMEM	1,0058	1,0224	1,3358

Tabelle 3.5: Die gemessenen Dichten (DMA 46, Anton Paar, Graz, Österreich), Viskositäten (Ubbelohde-Viskosimeter Typ 52510, Schott-Geräte, Hofheim am Taunus, Deutschland) und Brechungsindizes (Abbemat MW, Anton Paar) der verwendeten äußeren Phasen. Die Konzentration der isotonen Trehaloselösung lag bei 0,27 mol/l.

Der Messbereich der DLS liegt zwischen 3 nm bis ca. 3 μm , größere Partikel können mit dieser Methode nicht vermessen werden, weshalb mit der Laserdiffraktometrie im nächsten Kapitel ein weiteres Messverfahren für diese größeren Partikel verwendet wurde.

3.2.4.4.2 Laserdiffraktometrie

Als weitere Methode für die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung wurde der Laserbeugungsanalysator Coulter LS 13 320 (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet. Das Messprinzip beruht auf der Laserlichtbeugung (Laserdiffraktometrie, LD) kombiniert mit einer Polarisationsintensitätsdifferentialstreuung (polarization intensity differential scattering, PIDS). Diese LD/PIDS Technologie ermöglicht es, Partikel von 0,04 bis 2000 μm zu erfassen.

Das Verhalten von Licht beim Auftreffen auf einen Partikel ist abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes und der Größe des Partikels. Bei etwa gleich großen Dimensionen zwischen dem verwendeten Licht und dem Partikel wird das Licht gebeugt, die Wellen werden abgelenkt. Dadurch entstehen kreisförmige Beugungsmuster. Bei mehreren unterschiedlichen Partikelgrößen in der Probe werden daraus Interferenzmuster. Kleine Partikel erzeugen Ringe bzw. Beugungsmuster mit einem großen Abstand zueinander, was einem großen Beugungswinkel entspricht. Große Partikel bilden Beugungsmuster mit vielen kleinen Ringen aus. Die erhaltenen Beugungswinkel sind also umgekehrt proportional zur Größe der Partikel. Auf Grundlage der Beugungswinkel und weiteren gegebenen Parametern kann mit der Fraunhofer Theorie aus den Beugungsmustern die Partikelgröße berechnet werden. Diese Fraunhofer'sche Näherung gilt allerdings nur bei Partikelgrößen, die gemäß ISO 13320-1[116] mindestens 40-fach größer sind, als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes, was bei einem He-Laser mit einer Wellenlänge von 630 nm auf Partikel $>20 \mu\text{m}$ zutrifft.

Bei Partikeln, die deutlich kleiner als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes sind, überwiegt die Lichtstreuung. Diese beschreibt eine Ablenkung von Strahlung durch die Interaktion mit den Partikeln. Für die Berechnung der Partikelgröße aus dem Lichtstreuungsmuster von kleinen Partikeln wird die Mie-Theorie mit zusätzlichen

optischen Parametern verwendet (Brechungsindex des Dispersionsmediums: 1,33, Brechungsindex der dispersen Phase: 1,46, Absorptionsfaktor: 0,01). Diese Methode ist aber deutlich komplizierter und gerade bei multimodalen Partikelgrößenverteilungen im unteren Nanometerbereich ungenauer.

Aus diesem Grund wird für kleine Partikel hier die PIDS-Technologie verwendet. Dafür wird polarisiertes Licht verschiedener Wellenlängen auf die Partikel gestrahlt und das Streulicht an unterschiedlichen Raumpositionen gemessen. PIDS basiert auf oszillierenden Dipolmomenten und den damit verbundenen Eigenschaften des Lichtes, nicht in Richtung der Oszillation gestreut zu werden. In Abhängigkeit von der Polarisation des Lichtes und der Wellenlänge kommt es somit zu unterschiedlich starken Intensitäten, aus denen die Partikelgrößen berechnet werden. Mit der PIDS-Technologie können Partikel mit einer Größe von nur 40 nm bestimmt werden.

In den Diagrammen der Partikelgrößenverteilungen im Ergebniskapitel 4 wurden die Mittelwerte der Volumenverteilung des D_{10} , D_{50} und D_{90} -Wertes in einem gestapelten Balkendiagramm dargestellt. D_{10} bedeutet, dass 10 % der Partikel in der Probe kleiner als der angegebene Wert sind. Zusätzlich sind die arithmetischen Mittelwerte (mean) mit der dazugehörigen Standardabweichung eingezeichnet.

Wenn die mittleren Partikelgrößen ungefähr gleich sind, dann können die Verteilungen anhand der Breite miteinander verglichen werden (siehe Gleichung 3.2.14). Bei stark schwankenden mittleren Partikelgrößen, zum Beispiel aufgrund von unterschiedlichen Formulierungen, wird auf die Spanne aus Gleichung 3.2.15 zurückgegriffen, in der die Breite noch einmal durch den d_{50} -Wert normalisiert wird.

$$d_{\text{Breite}} = d_{90} - d_{10} \quad (3.2.14)$$

$$\text{Spanne} = \frac{d_{\text{Breite}}}{d_{50}} = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (3.2.15)$$

3.2.4.4.3 Nanopartikel-Tracking-Analyse

Eine weitere verwendete Methode zur Ermittlung der Partikelgrößenverteilung ist die Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA), welche diese in Suspensionen anhand der

Lichtstreuung und der Brown'schen Molekularbewegung bestimmt. Im Vergleich zur DLS (siehe Kapitel 3.2.4.4.1) wird zur Ermittlung der Partikelgröße aber nicht die Variation der Streulichtintensität, sondern die direkte Bewegung der einzelnen Partikel optisch ausgewertet. Um die Partikel sichtbar zu machen, wird ein Laserstrahl in die Probenkammer geleitet, der, sobald er auf Partikel trifft, gestreut wird. Das Streulicht wird mit einem Mikroskop vergrößert und die bewegten Partikel über eine Videokamera aufgezeichnet (vergleiche Abbildung 4.12 auf Seite 133). Die Analysensoftware verfolgt die bewegten Partikel und berechnet mit der Stokes-Einstein-Gleichung 3.2.13 den hydrodynamischen Durchmesser der analysierten Partikel.

Das verwendete Messgerät NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Worcestershire, England) kann Partikelgrößen in einem Bereich von 10 bis 2000 nm bestimmen und arbeitet in einem Konzentrationsbereich von 10^6 bis 10^9 Partikel pro ml.

3.2.4.4.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Als letzte Methode zur Beurteilung der Partikelgröße wurde die Elektronenmikroskopie verwendet. Der Messbereich ist mit unter 1 nm bis ca. 10 μ m sehr breit und neben der Partikelgrößenverteilung lässt sich anhand einer elektronenmikroskopischen Aufnahme auch eine Aussage über die Morphologie der untersuchten Nanopartikel treffen. Ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM) besitzt eine gewisse Analogie zur Lichtmikroskopie. Aus einer Elektronenkanone werden die emittierten Elektronen durch ringförmige Elektromagnete, den elektronenoptischen Linsen, gebündelt und damit ähnlich wie bei lichtoptischen Sammellinsen auf die Probe geleitet. Bei der Ruhebildmikroskopie wird die gesamte Probe auf einmal bestrahlt, bei der Rasterelektronenmikroskopie werden immer nur kleine Bereiche mit einem feinen Elektronenstrahl beschossen. Um die gesamte Probenoberfläche zu detektieren, wird der Elektronenstrahl durch Elektromagnete abgelenkt und die Probe dadurch zeilenweise abgerastert. Durch die Coulomb-Kräfte wird der Elektronenstrahl an den Atomkernen des Untersuchungsobjekts gestreut, was als Rutherford-Streuung von einem Detektor analysiert wird. Damit der Elektronenstrahl von der Probe ausreichend abgelenkt wird, was abhängig von der Ordnungszahl der Atome ist, muss diese vorher präpariert werden. Damit ist die Probenpräparation im Vergleich zu den anderen hier

beschriebenen Verfahren der Partikelgrößenbestimmung deutlich aufwändiger.

Die ANP-Formulierungen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop SUPRA 35 mit Transmissionsaufsatz (RTEM, Zeiss, Jena, Deutschland) bei 10 kV aufgenommen. Die Präparate wurden durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat hergestellt:

- 3,5 µl einer 1:100 verdünnten Probe werden unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung auf einen Kupferträger (Carbon Only Copper Grid, 200 Mesh, Science Service) aufgetragen, sodass die kohlenstoffbeschichtete Seite nach oben zeigt.
- Nach einminütigem Antrocknen werden die Überstände mit Filterpapier aufgenommen.
- Für die Negativkontrastierung wird mit Wasser eine 2 %-ige Uranylacetatlösung hergestellt. Um ausgefallenes Salz abzufiltrieren wird diese Lösung durch einen 0,22 µm Spritzenvorsatzfilter gegeben.
- 3,5 µl der 2 %-igen Uranylacetatlösung werden mit einer Pipettenspitze mit Filtereinsatz auf die angetrocknete Probe getropft.
- Nach 1,5 min Trockenzeit werden die Überstände erneut mit Filterpapier aufgenommen.
- Am Ende wird der Kupferträger 5 Minuten trocknen gelassen.

Weitere Aufnahmen wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop Libra 120 PLUS (Zeiss) bei 120 kV aufgenommen. Die SLN-Formulierungen wurden wieder durch Negativkontrastierung präpariert. Für die Probenpräparation der NE-Formulierungen kam mit der Gefrierbruchtechnik ein zweites Verfahren zum Einsatz:

- Die Probe wird zwischen zwei Goldträgern in schmelzendem Stickstoff bei -210 °C zum Erhalt der kolloidchemischen Struktur schockgefrostet.
- In der Gefrierbruchätzanlage BAF 400 (Balzers, Wiesbaden, Deutschland) wird die Probe bei einer Temperatur von -100 °C und einem Vakuum von 5×10^{-6} bar gebrochen.
- In einem Winkel von 45° werden die Bruchflächen mit einer 2 nm dicken Platin-Kohle-Schicht beschattet und in einem Winkel von 90° mit 20 nm reiner Kohle zur mechanischen Stabilisierung bedampft.

- Die erhaltenen Replika werden mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch (V/V 1:1) gereinigt und auf Kupfernetze überführt.

Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden anschließend mit dem GNU Image Manipulation Program (GIMP, freie Software) bearbeitet und ausgewertet.

3.2.4.5 Bestimmung des Zeta-Potentials

Das Zeta-Potential ermöglicht eine Abschätzung der Abstoßungskräfte der einzelnen Partikel untereinander. Es beschreibt das elektrische Potential der Abscherschicht eines bewegten Suspensionspartikels. Je größer der Betrag des Zeta-Potentials, desto größer sind die Abstoßungskräfte der Teilchen untereinander und desto geringer ist deren Agglomerationswahrscheinlichkeit. Wenn die Größe des Zetapotentials auf weniger als etwa 30 mV sinkt, dann verliert ein disperses System in der Regel an Stabilität.

Das Zeta-Potential basiert auf den Ladungsunterschieden zwischen zwei Phasen. An der Oberfläche von negativ geladenen Teilchen lagern sich Gegenionen aus dem umgebenden Medium in einer festen Schicht an. Weiter außen bildet sich eine diffuse Schicht aus, die aus ortsgebundenen und beweglichen Anionen sowie Kationen besteht und die Teilchen abschirmt, weshalb es nach außen neutral ist.

Werden die Teilchen durch ein elektrisches Feld bewegt, so kann die diffuse Schicht zwischen ortsgebundenen und beweglichen Ionen abgeschert werden, wodurch die Teilchen an dieser Abscherschicht ein Potential aufweisen. Je nach Potentialunterschied bewegen sich die Teilchen im elektrischen Feld unterschiedlich schnell, was mit einer interferometrischen Lasertechnik (M3-PALS, Phase Analysis Light Scattering, dt. Phasenanalyse der Lichtstreuung) gemessen werden kann. Diese Technik nennt sich Laser-Doppler-Mikro-Elektrophorese und ermöglicht die Berechnung der elektrophoretischen Mobilität, woraus das Zeta-Potenzial bestimmt werden kann. Die dafür notwendige relative Dielektrizitätskonstante (Permittivität) ist für die ANP mit einer ethanolischen äußeren Phase und einem Wassergehalt von 20 Gew.-% entsprechend dem Nachschlagewerk *Static Dielectric Constants of Pure Liquids and Binary Liquid Mixtures* auf 35,4 interpoliert wurden [117]. Verwendet wurde für die Messungen der Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, England).

3.2.4.6 Reinheits- und Konzentrationsbestimmung von BSA

Für die Auftrennung der ANP-Formulierung sowie die Bestimmung der Reinheit und Konzentration des BSA wurde eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, die SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, dt. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese), verwendet. Dabei bindet das SDS-Molekül an die denaturierten, entfalteten Proteinketten, sodass die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen und die Eigenladungen der Proteine vernachlässigbar gering werden. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes ermöglicht dies eine Auftrennung entsprechend der Kettenlänge, welche proportional zur Molekülmasse ist. Zusätzlich wirkt der Siebeffekt des Gels, dessen Porengröße durch die Konzentrationen an Monomer und Vernetzer bestimmt wird.

Als Gel kam das vorgefertigte Any kDTM Mini-PROTEAN TGX Gel (Bio-Rad Laboratories, California, USA) zum Einsatz, welches einen optimalen Trennungsbereich zwischen 10 und 100 kD aufweist. Es handelt sich dabei um ein Gradientengel, wodurch es möglich ist, hoch- und niedermolekulare Proben gleichmäßig über die Laufweite aufzutrennen. Dabei ermöglichen größere Poren an der Oberseite des Gels die Auflösung größerer Moleküle, wohingegen kleinere Porengrößen am Boden des Gels die übermäßige Trennung kleiner Moleküle begrenzen. Die SDS-PAGE wurde nach dem Bio-Rad Mini-PROTEAN[®]-Protokoll durchgeführt. Die Proteine wurden durch eine Coomassie-Brillant-Blau-Färbung mit dem QC Colloidal Coomassie Stain Kit (Bio-Rad) und nach der Vorgabe des Bio-Rad-Protokolls angefärbt. Als Molekülmassenstandard wurde der Precision Plus ProteinTM Dual Xtra Standard (Bio-Rad) bestehend aus 12 rekombinanten Proteinen zwischen 2 und 250 kD verwendet.

Für die densitometrische Auswertung wurde mit dem Gel-Imager 3026 (Vilber Lourmat, Collégien, Frankreich) ein binäres 14 bit Bild erzeugt, woraus anschließend anhand der optischen Dichte der BSA-Banden mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) eine BSA-Kalibriergerade berechnet wurde.

3.2.4.7 Gehaltsbestimmung

Der Gehalt an HYP-DCHA wurde mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) bestimmt. Bei dieser flüssigchromatografischen Methode werden die einzelnen Probenbestandteile durch ihre unterschiedlichen Löslichkeiten zwischen der stationären und der mobilen Phase aufgetrennt. Zusätzlich kommt es neben den Verteilungs- auch zu Absorptionsvorgängen, bei der die Probenbestandteile je nach Affinität reversibel an der Oberfläche der stationären Phase binden. Als stationäre Phase wurde eine Umkehrphasen-Säule (RP18, Thermo ScientificTM Hypersil ODS (C18), Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) mit einer Länge von 250 mm und einem Durchmesser von 4 mm verwendet. Es handelt sich dabei um eine modifizierte Kieselgelsäule mit sphärischen Partikeln in einem Durchmesser von 5 µm, bei der die polare Oberfläche des Kieselgels (Silanolgruppen) mit lipophilen Octadecyl-Gruppen modifiziert sind (C₁₈-Phase) und anschließend durch Endcapping nachsilyliert wurden. Zum Schutz der Hauptsäule wurde eine 10 x 4 mm lange Vorsäule mit einer Partikelgröße von 3 µm (Hypersil ODS Guard, Thermo Fisher Scientific) mit dem Vorsäulenkartuschenhalter Uniguard (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Die mobile Phase bestand aus Acetonitril und wässrigem 10 mmol/l Ammoniumdihydrogenphosphat-Puffer, der mit 1 mol/l konzentrierter Salzsäure auf einem pH-Wert von 2,5 eingestellt wurde. Das Volumenverhältnis von Acetonitril zu wässriger Phase lag bei 85:15. Die mobile Phase wurde isokratisch mit einer Pumpeinheit (600 Controller, WatersTM, Massachusetts, USA) in einer Fließmittelgeschwindigkeit von 2 ml/min durch die Säule befördert. Das Probevolumen von 20 µL wurde mit dem Autosampler 717 plus (WatersTM) injiziert. Die Analyse der aufgetrennten Probenbestandteile erfolgte durch einen UV-Detektor (Tunable Absorbance Detector 486, WatersTM) bei einer Wellenlänge von 270 nm.

Für die Gehaltsbestimmungen wurden die integrierten HYP-DCHA-Peaks durch die lineare Regression einer Kalibriergeraden (siehe weiter unten) einer Konzentration zugeordnet. Diese wurde mit der Ausgangs-HYP-DCHA-Konzentration ins Verhältnis gesetzt, woraus die Wiederfindung in Prozent bestimmt wurde.

Für die Beurteilung von chromatographischen Trennmethoden gibt es mehrere Parameter, die für die verwendete HPLC-Methode nach der ICH Q2(R1) Guideline [118] bestimmt wurden.

Einer der wichtigsten Parameter ist die Nachweisgrenze (limit of detection, LOD), bei der ein Stoff noch nachgewiesen werden kann, seine Konzentration aber nicht mehr exakt bestimmbar ist. Die ICH Q2(R1) Guideline beschreibt mehrere Methoden zur Bestimmung der Nachweisgrenze. Eine Definition orientiert sich an dem Signal-Rausch-Verhältnis (signal to noise, S/N), welches aus der doppelten Peakhöhe H der zu bestimmenden Substanz und der maximalen Höhe h des Rauschens der Basislinie gebildet wird (Gleichung 3.2.16).

$$S/N = \frac{2H}{h} \quad (3.2.16)$$

Die Höhe der Basislinienschwankung (h) wird dabei über eine Distanz von der 20-fachen Breite der halben Peakhöhe betrachtet. Ein $S/N > 3$ ist für den Nachweis einer Substanz ausreichend. Für die hier verwendete Methode ergibt eine HYP-DCHA-Konzentration von $0,072 \mu\text{mol/l}$ ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3,66 ($n = 3$), was demnach oberhalb der Nachweisgrenze liegt und hier als niedrigste noch zu qualifizierende Konzentration bestimmt wurde.

Ein weiterer Parameter ist die Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ), also die niedrigste Menge, bei der ein Stoff mit hinreichender Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann. Für die Bestimmungsgrenze kann wieder das Signal-Rausch-Verhältnis verwendet werden, welches über 10 liegen sollte. Für die niedrigste verwendete HYP-DCHA-Konzentration von $0,348 \mu\text{mol/l}$ konnte nach Gleichung 3.2.16 ein Signal-Rausch-Verhältnis von 12,19 ($n = 3$) bestimmt werden.

Die verwendete Kalibriergerade hatte eine Steigung von $12,47 \text{ pdu/min}$ mit einem Achsenabschnitt von $1,15 \text{ pdu}$ und einem Bestimmtheitsmaß von $0,99999$.

3.2.4.7.1 Probenaufbereitung SLN

Die Lipidnanopartikel-Formulierungen müssen vor der HPLC-Analytik aufbereitet werden, da die im Fließmittel der HPLC unlöslichen festen Lipide ansonsten die Säule der HPLC-Anlage verstopfen. Bevor die SLN abgetrennt werden, muss allerdings das HYP-DCHA herausgelöst werden. Dafür wird, wie in Abbildung 3.9 beschrieben, die SLN-Formulierung in einem ersten Schritt mit Chloroform aufgelöst. Dadurch wird das im Lipid eingeschlossene HYP-DCHA freigesetzt und die kleinen, nur schwer abzutrennenden Nanopartikel werden zerstört. Mit Ethanol wird das Lipid ausgefällt und durch Zentrifugation (Allegra 64R, Beckman Coulter, Brea, USA) im unteren Bereich eines 1,5 ml großen Mikroreaktionsgefäßes aufkonzentriert. Der lipidfreie Überstand kann danach mit der HPLC-Methode analysiert werden.

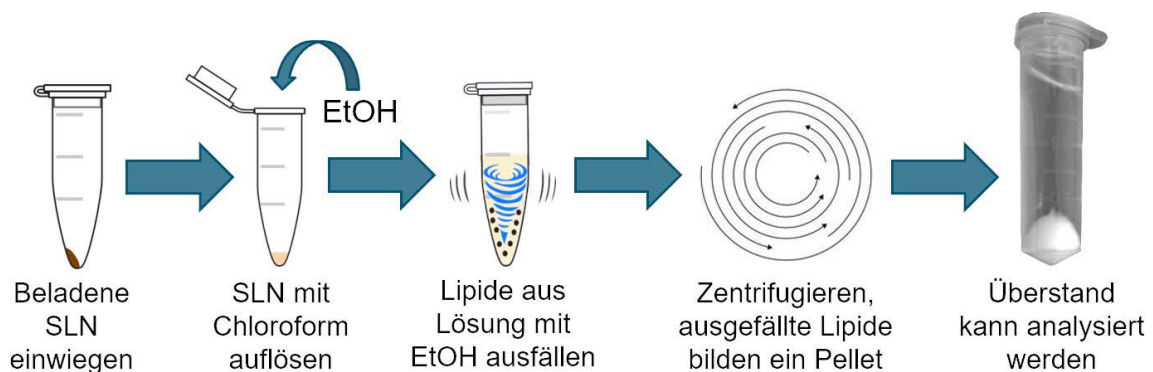


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der Probenaufbereitung für die SLN-haltigen Formulierungen.

Das konkrete Vorgehen bei der Probenvorbereitung ist im Einzelnen, wie folgt, aufgelistet.

- Lipidmatrix oder SLN-Formulierung in Trichlormethan (Chloroform) auflösen, Verhältnis 1:7 (0,02 g SLN : 100 µl Chloroform).
- Lipid mit Ethanol ausfällen, Verhältnis 1:7 (0,17 g Lösung : 1,5 ml Ethanol).
- Präzipitat abzentrifugieren (30.000 RPM, F1202, 5 min, 20 °C, 5 ACC/DCC).
- Überstand dekantieren und mittels HPLC analysieren.

3.2.4.7.2 Kalibriergerade NE

Die Messung der HYP-DCHA-Konzentrationen in den NE-Formulierungen ist nicht mit der Standardkalibriergeraden möglich, da es im HPLC-Chromatogramm durch den Rezepturgrundstoff MCT zu Peaküberlagerungen mit dem HYP-DCHA-Peak kommt.

Eine der vielen Absorptionen des MCT in den NE-Formulierungen bei 270 nm überlagert sich mit der Retentionszeit von HYP-DCHA (siehe Abbildung 3.10). Bei der beladenen NE-Formulierung ist bei einer Retentionszeit von ca. 8,5 min ein deutlicher Hyperforin-Peak zu erkennen, der einen der MCT-Peaks einschließt (vergleiche Chromatogramm von reinem MCT in der Abbildung 3.10). Außerdem ist bei der Retentionszeit von etwa 9,8 min der Adhyperforin-Peak sichtbar. Aufgrund der fehlenden Basislinientrennung zwischen dem Hyperforin- und dem MCT-Peak kommt es zu einer Überinterpretation der HYP-DCHA-Wiederfindung in den NE-Formulierungen. Um die analytische Methode nicht verändern zu müssen, wurde deshalb für die Bestimmung der HYP-DCHA-Konzentration in den NE-Formulierungen eine eigenständige Kalibriergerade angefertigt. Hierfür wurde den aufsteigenden HYP-DCHA-Konzentrationen eine zu den NE-Formulierungen äquivalente Menge MCT zugesetzt.

Die resultierende Kalibriergerade hatte eine Steigung von 5,02 pdu/min mit einem Achsenabschnitt von 0,92 pdu und einem Bestimmtheitsmaß von 0,999946.

Zusätzlich wurde die HYP-DCHA-Kalibriergerade mit MCT durch das Standard-Additionsverfahren (Ph. Eur. Zusatzmethode) überprüft, um alle Matrix-Effekte mit einzuschließen. Dafür wurden in die mit 10 µmol/l HYP-DCHA-beladenen NE-Formulierungen unterschiedliche Mengen (Additionen) einer 10 µmol/l HYP-DCHA-Stammlösung zugesetzt. Aufgrund des linearen Zusammenhangs konnten durch Extrapolation die Konzentrationen der ermittelten Flächen berechnet werden. Die dadurch erhaltene Kalibriergerade nach dem Standard-Additionsverfahren war identisch zu der vorher angefertigten HYP-DCHA-Kalibriergeraden mit MCT.

Anmerkung:

Es wurden alle Einzelbestandteile der NE-Formulierung chromatographisch unter-

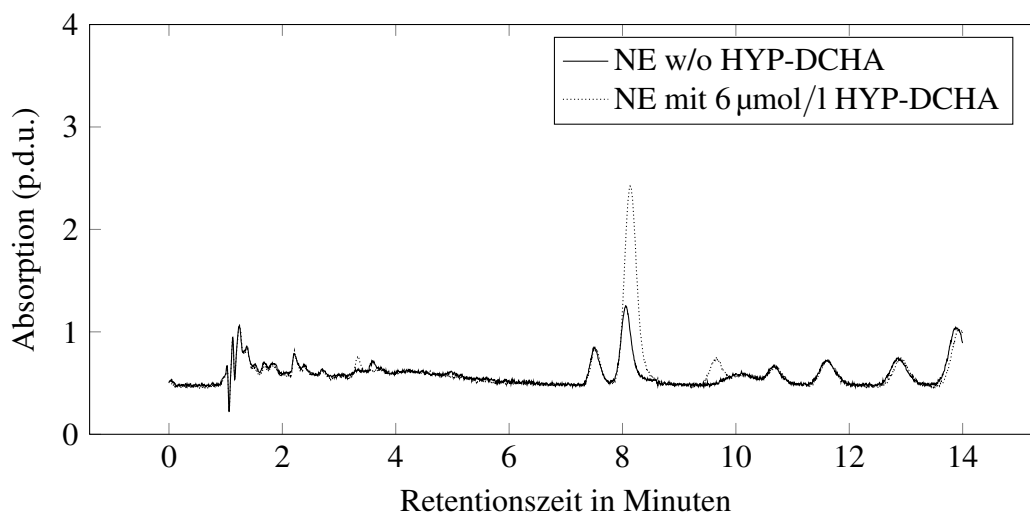


Abbildung 3.10: HPLC-Chromatogramm von einer unbeladenen NE-Formulierung und von einer NE-Formulierung mit einer HYP-DCHA-Beladungskonzentration von 6 µmol/l (gepunktete Linie).

sucht und nur bei MCT eine Absorption bei 270 nm festgestellt. Da MCT aus gesättigten Fettsäuren besteht, existieren eigentlich keine Chromophore, die eine Absorption bei dieser Wellenlänge aufweisen. Die Untersuchung von MCT aus einem neuen Gebinde ergab ein ähnliches Chromatogramm, weshalb nachträgliche Verunreinigungen im verwendeten Gebinde ausgeschlossen werden können. Demnach muss es sich bei den absorbierenden Substanzen um Verbindungen aus dem Herstellungsprozess von MCT handeln.

3.2.4.7.3 Bestimmung der HYP-DCHA-Konzentration in der äußeren Phase

Um die HYP-DCHA-Konzentration in der äußeren Phase der Formulierungen zu bestimmen, wurden die Nanopartikel mit Zentrifugenfiltern abgetrennt. Dafür wurden die Vivaspins® 6 (Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einer Polyethersulfon-Membran und einem Molecular Weight Cut Off (MWCO) von 100 000 Dalton verwendet (Abbildungsteil 3.11 (a)). Das MWCO von 100 000 Dalton entspricht einer Maschenweite von ca. 3 nm, was die ca. 100 nm großen Nanopartikel wirkungsvoll

zurückhält, ohne den Filter zu schnell zu verstopfen, wohingegen freies BSA sowie ggf. ausgefallenes oder gelöstes HYP-DCHA den Filter ungehindert passieren können. Die Filtration wurde mit einer Allegra 64R Zentrifuge (C1015 Rotor, Beckman Coulter, Brea, USA) und 1000 rpm für 30 min durchgeführt, wodurch ca. 1,5 ml an äußerer, wässriger Phase gewonnen wurden.

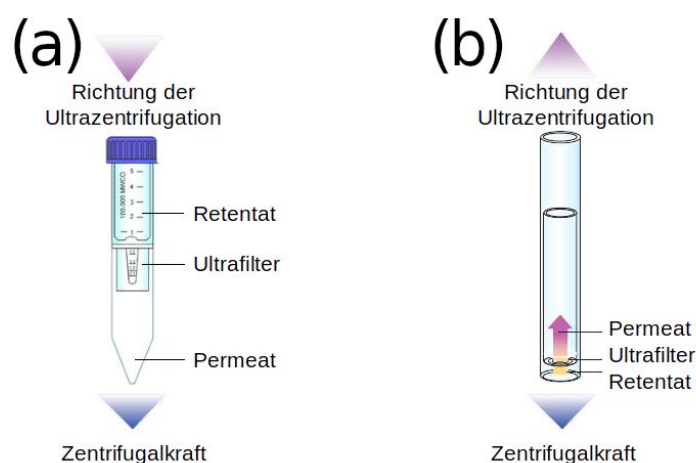


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung von (a): Vivaspin® 6, (b):Centrisart® I (Quelle: Sartorius, eigene Bearbeitung).

Die Filtergängigkeit für HYP-DCHA wurde im Vorfeld verifiziert, außerdem mussten die Vivaspins® vor der Verwendung mit Ethanol und anschließend zwei Mal mit bidestilliertem Wasser gespült werden, um Verunreinigungen aus den Filtermembranen zu entfernen, die störend in der HPLC-Analytik waren. Da die Vivaspins® eigentlich nur für die Aufkonzentrierung von Proben konzipiert wurden, sind im späteren Verlauf die im Folgenden beschriebenen Centrisarts® I (Sartorius) für die Abtrennung der Nanopartikel verwendet wurden.

Die im Abbildungsteil 3.11 (b) dargestellten Centrisarts® mit 100 000 Dalton sind speziell für die Gewinnung des Filtrats ausgelegt. Etwa ein Milliliter der Formulierung wird in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und darauf ein im Durchmesser etwas kleineres Röhrchen mit Filterboden gesetzt. Durch Anlegen einer Zentrifugalkraft (64R Zentrifuge, C1015 Rotor, Beckman Coulter) bei 1000 rpm für 10 min sammelt sich auf der Membranoberseite des inneren Röhrchens das Filtrat der Formulierung.

3.2.5 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden die Stabilität von HYP-DCHA unter standardisierten Zellkulturbedingungen und der Einfluss von beladenen kolloidalen Formulierungen auf die Viabilität der verwendeten HaCaT-Zellen untersucht; die verwendeten Materialien, Medien und die HaCaT-Zelllinie sind im Kapitel 3.1.4 genauer beschrieben.

3.2.5.1 Mediumwechsel und Passagieren

Die Kultivierung der HaCaT-Zellen fand kontinuierlich bei 37 °C unter befeuchteter Atmosphäre mit 5 % CO₂ in einem Standardmedium aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit diversen Additiven (siehe Kapitel 3.1.4) und 10 % fetalen Kälberserum (FCS) in T-25 Gewebekulturflaschen (Greiner, Kremsmünster, Österreich) statt. Während der Kultivierung wurde das Medium (6 ml) dreimal pro Woche ausgetauscht.

Aufgrund der Eigenschaft von adhärenenten Zelllinien in der Regel nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers nicht weiter zu proliferieren und stattdessen zu differenzieren, wurden die Zellen regelmäßig passagiert. Dafür wurden die Zellen zuerst mit 2 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS, MP Bio-medicals, Santa Ana, USA) gewaschen und dann zum Komplexieren von Ca₂⁺ und Mg₂⁺ für 6 min mit 2 ml EDTA (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Als letzter Vorbereitungsschritt wurde der Monolayerverband aufgelöst, um die Zellen zu vereinzeln. Dafür wurden diese enzymatisch für 6 min mit 2 ml Trypsin beaufschlagt (Sigma-Aldrich). Anschließend konnten die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst werden. Die neue Subkultur wurde mit ca. 250000 Zellen angelegt und war nach etwa 6 bis 7 Tagen konfluent. Die HaCaT-Zellen wurden maximal bis zur Passage 100 verwendet.

3.2.5.2 Viabilitätstest

Mit dem Viabilitätstest wird die Aktivität der mitochondrialen und cytosolischen Dehydrogenase von lebenden Zellen gemessen. Diese Aktivitätsdaten sind unabhängig von der Proliferation der Zellen.

Zur Vorbereitung des Viabilitätstests wurden etwa 10000 Zellen (200 µl) pro Vertiefung in eine 96er Mikrotiterplatte (well plate, TPP, Trasadingen, Schweiz) eingesät und für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und durch 200 µl der jeweiligen Proben ersetzt und erneut für 24 Stunden inkubiert.

Für die Untersuchung der Zell-Viabilität wurden nach dem Absaugen der Probe 200 µl des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT, Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) hinzugegeben, welches vorher im Verhältnis 1:10 mit DMEM und 10 % FCS verdünnt wurde. Das schwach gelbe MTT dringt in die Zellen ein, wo der Tetrazoliumring je nach Zellaktivität durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System im Cytosol und von aktiven Mitochondrien aufgebrochen wird. Dadurch entstehen wasserunlösliche, dunkelblaue Formazankristalle [119, 120]. Nach 2-stündiger Inkubation der MTT-Lösung wurde diese abgesaugt und das gebildete Formazan innerhalb von zwei Stunden durch 200 µl Lyse-Lösung freigesetzt. Die Lyse-Lösung bestand aus 0,273 % Natriumlaurylsulfat (SDS), 0,365 % Salzsäure mit einer Konzentration von 30 bis 35 %, 90,545 % Isopropanol und 8,818 % gereinigtem Wasser.

Die Auswertung erfolgte photometrisch mit dem PowerWave Mikroplatten-Spektrophotometer (BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 570 nm. Wichtig ist, dass der Viabilitätstest zeitnah ausgewertet wird, da sich der Farbstoff bei Raumtemperatur und Lichteinfluss abbaut. Das Grundrauschen wurde von den gemessenen Absorptionen subtrahiert und anschließend in Relation zu einer Kontrollprobe aus reinem Standardmedium gesetzt. Als Negativkontrolle für die Viabilität wurden die Zellen mit 1 % Triton X-100 (ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland) versetzt. Das nichtionische Tensid führt zu einer Zelllyse, womit die Umsetzung des MTT verhindert wird.

4 Ergebnisse und Diskussion

Das Ergebniskapitel ist in mehrere Unterkapitel gegliedert. Im ersten Kapitel 4.1 wird das als Pharmakon eingesetzte Hyperforin-Dicyclohexylammonium-Salz (HYP-DCHA) beschrieben und auf seine Temperatur- sowie Lagerstabilität untersucht. Die Ergebnisse aus diesem Kapitel sind für alle nachfolgenden Formulierungsmethoden entscheidend, um die Stabilität des Wirkstoffs nicht zu beeinträchtigen. Speziell die Temperatur begrenzt hierbei die Herstellung innerhalb spezifischer Rahmenparameter.

Die beiden folgenden Kapitel handeln von den eingesetzten Arzneistoffträgersystemen für das HYP-DCHA. Als erstes System werden in Kapitel 4.2 ab Seite 90 die hydrophilen Protein-Nanopartikel behandelt. Neben der physikochemischen Charakterisierung der Formulierungen werden die Einflussfaktoren Temperatur, Beladungszeitpunkte, Beladungskonzentrationen und der Einfluss der hydrophilen Protein-Nanopartikel-Konzentration untersucht.

Die Beschreibung von lipidbasierten Nanopartikeln folgt in Kapitel 4.3 ab Seite 122. Untersucht werden zwei unterschiedliche Formulierungsstrategien, die sich konkret im Aggregatzustand des Lipides bei Raumtemperatur unterscheiden. Die Prozessparameter wurden mit einem Design of Experiments optimiert.

Das letzte Ergebniskapitel 4.4 veranschaulicht ab Seite 161 den Einfluss der in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen drei Formulierungen auf eine Keratinozyten-Zelllinie. Die Zellkulturexperimente geben damit einen ersten Anhaltspunkt auf die Interaktion der Formulierungen mit menschlicher Epidermis.

Jedes Ergebnis wird direkt nach der Vorstellung kurz diskutiert, um die wichtigsten Aspekte des Experiments zu beschreiben und herauszustellen. Die abschließende Diskussion aller Ergebnisse erfolgt in Kapitel 5 ab Seite 171. Dort wird auch ein kurzer Ausblick in die Zukunft gewagt.

Wird in den Ergebniskapiteln der Begriff Signifikanz verwendet oder sollten Werte einen signifikanten Unterschied aufweisen, dann wurde dies, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, mit dem Zwei-Stichproben-t-Test bzw. dem Welch-Test ermittelt.

4.1 Hyperforin-Dicyclohexylammonium-Salz

Das HYP-DCHA hat eine Schmelztemperatur von 160,66 °C (vergleiche DSC-Messungen und Mikroskopie-Aufnahmen in Kapitel 4.3.3). Für den Laboralltag wurde die Stabilität des HYP-DCHA als ethanolische Stammlösung mit 70 µmol/l und einer Lagerung im Kühlschrank bei 8 °C untersucht. Die HYP-DCHA-Wiederfindung beträgt unter diesen Bedingungen nach 6 Wochen 101 %. Nach drei Jahren lassen sich 61 % der ursprünglichen HYP-DCHA-Konzentration nachweisen.

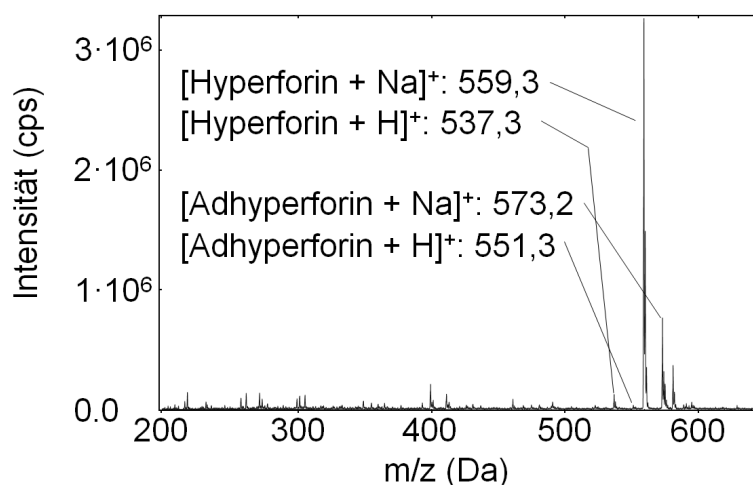


Abbildung 4.1: ESI-MS-Massenspektrum einer ethanolischen 70 µmol/l HYP-DCHA-Lösung nach 2 Stunden bei einer Lagertemperatur von 60 °C. Das Hyperforin und Adhyperforin werden im Massenspektrum durch die entsprechenden Quasimolekül-Ionen $[M + H]^+$ und $[M + Na]^+$ dargestellt.

Die Voraussetzung für bestimmte Beladungszeitpunkte der hydrophilen Protein-Nanopartikel (siehe Kapitel 4.2) ist die Stabilität des HYP-DCHA über 2 Stunden

bei einer Temperatur von 60 °C. Zur Überprüfung der HYP-DCHA-Stabilität unter diesen Bedingungen wurde die ethanolische HYP-DCHA-Stammlösung mit 70 µmol/l für 2 Stunden in einem Wasserbad bei 60 °C temperiert und anschließend mit einem Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometer (ESI-MS) auf Abbauprodukte des HYP-DCHA untersucht. In dem Massenspektrum in Abbildung 4.1 sind weder Abbauprodukte noch andere Hyperforin-Analoga oder Oxidationsprodukte zu erkennen. Den Großteil der Intensitäten macht das Hyperforin (536 u) aus, welches zusammen mit Wasserstoff (1 u) und Natrium (23 u) die Quasimolekül-Ionen $[M + H]^+$ mit 537 u und $[M + Na]^+$ mit 559 u bildet. Da in dem HYP-DCHA-Salz auch Adhyperforin (550 u) enthalten ist (siehe Kapitel 2.1.1), ergeben sich daraus zusammen mit Wasserstoff und Natrium die anderen, im Massenspektrum beschriebenen Intensitäten.

Lagertemperatur 40 °C		Lagertemperatur 60 °C	
Zeit (Monate)	HYP-DCHA WF ± SD (%)	Zeit (Stunden)	HYP-DCHA WF ± SD (%)
0,5	87,10 ± 1,19	2,0	99,55 ± 0,59
1,0	89,26 ± 1,24	4,0	101,65 ± 1,19
7,0	64,24 ± 0,58		

Tabelle 4.1: Einfluss unterschiedlicher Lagertemperaturen auf die Stabilität einer ethanolischen 70 µmol/l HYP-DCHA-Lösung (n = 3).

Durch eine mehrmonatige, dunkle Lagerung bei einer erhöhten Temperatur von 40 °C wurde ein beschleunigter HYP-DCHA-Abbau nach der ICH Q1A(R2) Guideline simuliert (Tabelle 4.1) [121]. Die Bestimmung der Wiederfindung des HYP-DCHA erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) (HPLC-Methode in Kapitel 3.2.4.7). Neben der mehrmonatigen Lagerung bei 40 °C wurden auch für einige Stunden Proben bei 60 °C eingelagert und analysiert (Tabelle 4.1).

Nach 7 Monaten konnten bei 40 °C noch 64 % der ursprünglich eingesetzten HYP-DCHA-Konzentration mit der HPLC-Methode wiedergefunden werden. Die HPLC-Chromatogramme für die 40 °C-Proben nach 0 Tagen und nach 7 Monaten sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Der Hyperforin-Peak hat eine Retentionszeit von 9,9 Minuten und der Adhyperforin-Peak von 11,9 Minuten. Das Verhältnis der Hyperforin-

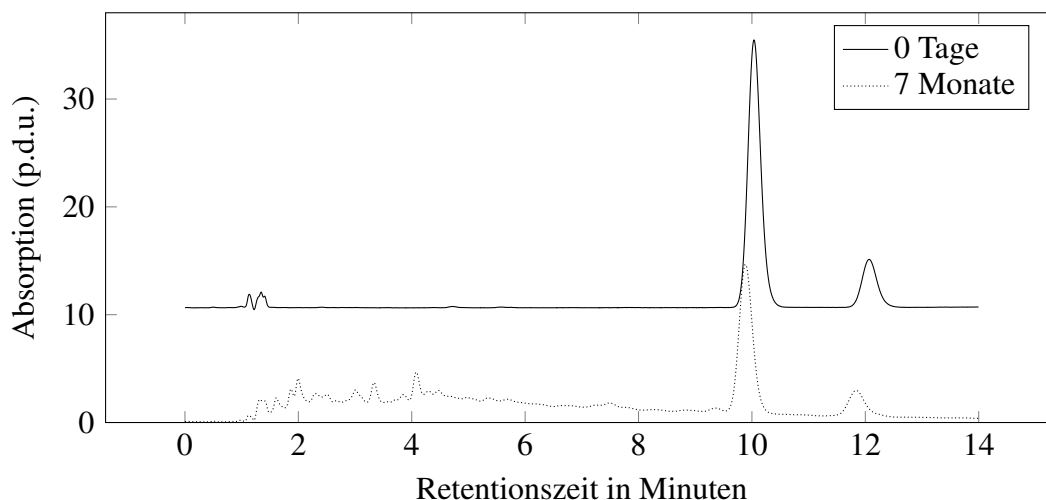


Abbildung 4.2: HPLC-Chromatogramm einer ethanolischen Lösung mit 70 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA nach 0 Tagen und nach 7 Monaten (gepunktete Linie) bei einer Lagertemperatur von 40 °C.

zur Adhyperforin-Fläche (AUC) liegt bei 4,8. Dies entspricht der HYP-DCHA-Salz-Zusammensetzung von 82,10 % Hyperforin-DCHA und 17,23 % Adhyperforin-DCHA, wie sie vom Hersteller angegeben wird (vergleiche Kapitel 3.1.1).

Nach der siebenmonatigen Lagerung bei 40 °C wurden neben den Hyperforin- und Adhyperforin-Peaks 17 weitere Peaks detektiert (Abbildung 4.2). Die 60 °C-Proben wurden nur bis zur vierten Stunde untersucht, da eine Stabilität von 2 Stunden für die Experimente im nächsten Kapitel 4.2 ausreichend ist. Nach 4 Stunden bei 60 °C wurde eine HYP-DCHA-Wiederfindung von 102 % bestimmt.

Diskussion

HYP-DCHA ist in einer ethanolischen Lösung bei einer Lagertemperatur von 8 °C für mindestens 6 Wochen stabil. Bei 40 °C liegt die Wiederfindung nach einem Monat bei etwa 90 %. Nach 7 Monaten lassen sich im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 4.2) zusätzliche Peaks detektieren, die auf Abbau- bzw. Oxidationsprodukte des HYP-DCHA schließen lassen. Da nach 7 Monaten nur noch 64 % des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden wurde, könnte die Konzentration der HYP-DCHA-Abbauprodukte groß genug sein, um mit der HPLC-Methode detektiert zu werden. Eine Identifizierung die-

ser zusätzlichen Peaks wurde nicht durchgeführt, da die verwendete HPLC-Methode dafür ungeeignet ist und keine gute Trennleistung dieser Peaks aufweist.

Im Massenspektrum konnten bei 60 °C nach 2 Stunden keine Abbauprodukte nachgewiesen werden. Der Hauptpeak entsprach dem Quasimolekül-Ion $[M + H]^+$, wie er auch in der Literatur beschrieben ist [122]. Es konnten keine Hyperforin-Fragmente identifiziert werden, was für eine schonende Ionisierung spricht [123].

Damit ist es möglich, das HYP-DCHA als ethanolische Stammlösung über mehrere Wochen im Kühlschrank zu lagern. Darüber hinaus ist die Stabilität von HYP-DCHA für nachfolgende Experimente bei einer Temperatur von 60 °C für mindestens 2 Stunden gewährleistet, nach den HPLC-Daten sogar für bis zu 4 Stunden.

4.2 Hydrophile Protein-Nanopartikel

Das Ziel war es, mit Albumin-Nanopartikeln (ANP) aus Bovinem Serumalbumin (BSA) das empfindliche und schwer wasserlösliche HYP-DCHA vor äußeren Einflüssen zu schützen und in eine wässrige, applizierbare Form zu überführen. Die dafür durch Desolvatation hergestellten Albumin-Nanopartikel wurden, wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, thermisch quervernetzt. Im ersten Teil dieses Kapitels wird die Partikelgröße der ANP-Formulierungen untersucht, da diese einen direkten Einfluss auf das pharmakokinetische Verhalten des HYP-DCHA hat (siehe Kapitel 2.2). Im zweiten Abschnitt werden die Beladungskapazität bzw. die Wiederfindung und damit die Stabilität des HYP-DCHA in den ANP-Formulierungen betrachtet.

Bei der Herstellung der Albumin-Nanopartikel haben, wie im Theoriekapitel 2.2.2.1 beschrieben, viele Einzelfaktoren einen Einfluss auf die resultierende Partikelgröße. Da unter konstantem pH-Wert, mit gleichbleibendem Desolvatationsreagenz und konstanter Geschwindigkeit der Desolvatation gearbeitet wurde (siehe Methodenkapitel 3.2.3.1), mussten diese Einflussfaktoren nicht weiter berücksichtigt werden. Variiert wurden die Beladungszeitpunkte, die Beladungskonzentration mit HYP-DCHA und die Konzentration der ANP. Für Experimente in der Zellkultur (ab Kapitel 4.4) war es notwendig, die nach der ANP-Herstellung aus über 80 % (v/v) Ethanol bestehende äußere Phase gegen eine wässrige, nicht zelltoxische Phase auszutauschen. Als neue äußere Phase wurde zum einen eine isotone Trehaloselösung mit 0,27 mol/l Trehalose und zum anderen das Kulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet.

4.2.1 Herstellung und physikochemische Charakterisierung

Die Abbildung 4.3 zeigt unbeladene ANP, die mit einem Rasterelektronenmikroskop mit Transmissionsaufsatz (RTEM) aufgenommen wurden. Die Präparate für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden, wie in Kapitel 3.2.4.4 beschrieben, durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat hergestellt. Die hydrophilen Protein-Nanopartikel bilden runde Assoziate mit einem Durchmesser von 80 bis 90 nm. In der

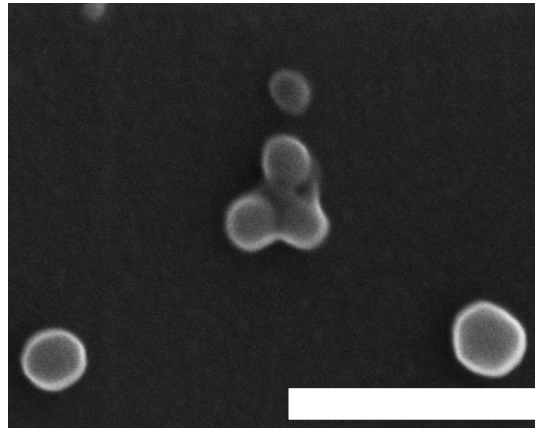


Abbildung 4.3: Rasterelektronenmikroskopaufnahme von unbeladenen Albumin-Nanopartikeln bei 10 kV, Maßstabsbalken 300 nm.

Mitte des Bildes ist ein Agglomerat aus drei einzelnen ANP zu erkennen.

Diskussion

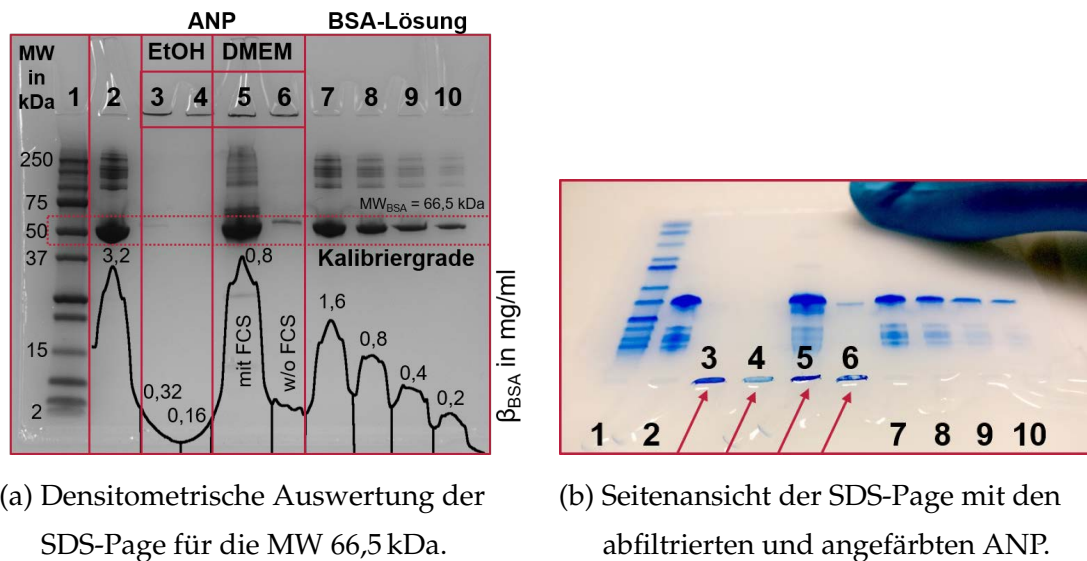
Die in Abbildung 4.3 dargestellten Agglomerate der ANP sind in der Regel durch Schütteln wieder redispersierbar. Sollten diese allerdings zu dicht zusammengelagert sein, dann ist die Vereinzelung durch Schütteln nicht mehr möglich. Diese irreversible Flockung entsteht beispielsweise beim Zentrifugieren der ANP-Formulierung (vergleiche Methodenkapitel 3.2.4.7.3) oder gelegentlich während des Austausches der äußeren Phase durch ein geringfügiges Aufkonzentrieren der ANP-Formulierung (siehe Kapitel 4.2.1.3). In den folgenden Kapiteln wird die Tendenz und damit die Problematik der ANP-Agglomeration mehrfach thematisiert und näher erläutert. Obwohl die elektronenmikroskopische Aufnahme eine Agglomeration der ANP zeigt, kann dies nicht als genereller Beweis für Agglomerate in der Formulierung verwendet werden, da die Präparation der Proben durch das Verdampfen der äußeren Phase eine zusätzliche Zusammenlagerung der ANP begünstigt.

4.2.1.1 BSA-Reinheit und freier BSA-Anteil in den ANP-Formulierungen

Für die Untersuchung der BSA-Reinheit und des Anteils an freiem BSA in den ANP-Formulierungen wurde eine SDS-Page durchgeführt (siehe Methodenkapitel 3.2.4.6).

Die Abbildung 4.4 (a) zeigt in der ersten Spur (1) den Molekülmassenstandard Dual Xtra für die Laufweiten der Molekülmassen mit 2, 5, 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 und 250 kDa. Die Spuren (2) und (7 – 10) bilden bei 66,5 kDa die Kalibriergerade für die densitometrische Auswertung der BSA-Konzentration in den ANP-Formulierungen. Durch die Linearität zwischen Farbmenge und optischer Dichte lässt sich mit der Densitometrie und einer Kalibriergeraden auf die Konzentration der Substanz in einer Bande schließen. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ (siehe Methodenkapitel 3.2.4.6) und ist als grafischer Verlauf im unteren Teil der Abbildung 4.4 (a) eingezeichnet. Die Spuren (3) und (4) zeigen die ANP-Formulierung nach der Herstellung. Aufgrund ihrer ethanolischen äußeren Phase schwimmen die ANP-Formulierungen in den Taschen auf, weshalb sie mit dem für die Gelelektrophorese verwendenden Puffer verdünnt werden mussten. Die Ausgangskonzentration der ANP-Formulierungen betrug nach der Herstellung 0,8 mg/ml BSA. Die für die Spur (3) und (4) verdünnten ANP-Formulierungen hatten eine BSA-Konzentration von 0,32 mg/ml bzw. von 0,16 mg/ml. Die Albumin-Nanopartikel sind zu groß, um durch das Gel zu wandern. Sie wurden, wie in den in Abbildungsteil 4.4 (b) gezeigten Pfeilen, vom Gel zurückgehalten. Aus diesem Grund sind nur ganz schwache Banden von ungebundenem BSA in den Spuren (3) und (4) zu erkennen. In der Seitenansicht in Abbildungsteil 4.4 (b) ist die Tasche (4) im Vergleich zur Tasche (3) deutlich schwächer angefärbt. Dies liegt an dem Konzentrationsunterschied zwischen den beiden ANP-Verdünnungen.

Nach dem Austausch der äußeren ethanolischen Phase mit DMEM konnte die ANP-Formulierung unverdünnt mit der nach der Herstellung vorliegenden BSA-Konzentration von 0,8 mg/ml in die Tasche (6) eingebracht werden. Die Dichteunterschiede zwischen der Formulierung mit der neuen wässrigen äußeren Phase und dem SDS-Page-Puffer waren gering genug, damit die Probe nicht mehr aufschwamm. Die Spur (6) zeigt eine schwache Bande mit einer Konzentration von unter 0,2 mg/ml des nicht zu ANP-gebundenen BSA. Es sind keine Verunreinigungen durch Serumproteine aus der verwendeten BSA-Fraktion zu erkennen. Anders sieht das Ergebnis in Spur (5) aus. Hier wurde als äußere Phase DMEM mit einem für die Zellkultur wichtigen Zusatz von 10 % FCS (fetal calf serum) verwendet. Der Hauptbestandteil des FCS ist BSA, welches eine Bande mit einer Äquivalenzkonzentration von etwa 3,2 mg/ml BSA



(a) Densitometrische Auswertung der SDS-Page für die MW 66,5 kDa.

(b) Seitenansicht der SDS-Page mit den abfiltrierten und angefärbten ANP.

Abbildung 4.4: SDS-Page mit folgenden Spuren: (1) Molekülmassenstandard von 2 bis 250 kDa, (2) wässrige BSA-Lösung mit 3,2 mg/ml BSA, (3, 4) ANP-Formulierungen mit 0,32 und 0,16 mg/mL BSA, EtOH und Puffer als äußere Phase, (5) ANP nach dem Phasenaustausch mit DMEM und 10 % FCS, (6) ANP nach dem Phasenaustausch mit DMEM ohne FCS, (7 – 10) wässrige BSA-Kalibriergerade von 1,6 bis 0,2 mg/ml BSA.

ausbildet. Die weitere Zusammensetzung von FCS ist in Kapitel 3.1.4.2 beschrieben. Durch den Vergleich mit der ANP-Formulierung ohne FCS in Spur (6) lässt sich durch die densitometrische Auswertung der Banden der Gehalt an freiem BSA in den FCS-haltigen ANP-Formulierungen bestimmen. Dieser liegt bei über 3 mg/ml BSA. Auch in den Taschen (5) und (6) lassen sich in Abbildungsteil 4.4 (b) die zurückgehaltenen und mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbten ANP, durch die Pfeile hervorgehoben, identifizieren.

Diskussion

Das BSA-Molekül ist mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 7,4 bis 8,2 nm [124, 125] im Vergleich zu den ca. 90 nm großen ANP deutlich kleiner und

kann somit während der Elektrophorese durch das Gel wandern. Die ANP hingegen werden vom Gel abfiltriert. Damit kann die SDS-Page nicht nur zur Bestimmung des freien BSA-Anteils in den ANP-Formulierungen verwendet werden, sondern auch als Methode zur Aufreinigung der Albumin-Nanopartikel. Das Ausschneiden der partikelgefüllten Taschen (3) bis (6) und das anschließende Resuspendieren der Partikel in EtOH war allerdings nicht erfolgreich. Die resuspendierte ANP-Formulierung zeigte keine monomodale Partikelgrößenverteilung. Die Maßnahmen zur Resuspendierung der ANP mit Ultraschall brachten nur eine geringfügige Verbesserung. Neben der erwarteten Partikelgröße von 90 nm waren viele größere Partikelfraktionen messbar. Dies bestätigt das schon in dem vorherigen Kapitel angedeutete Agglomerationsverhalten der ANP bei der Aufkonzentrierung der Formulierung (siehe auch Kapitel 4.2.1.3).

Die Spuren (2) und (7 – 10) der Kalibriergerade geben aufgrund der vielen Banden > 66,5 kDa einen Eindruck über die Verunreinigungen durch Serumproteine in der verwendeten BSA-Fraktion (siehe Materialien in Kapitel 3.1). Das für die Kalibriergerade verwendete BSA ist identisch mit dem für die ANP-Herstellung verwendeten BSA. Die größte Bande bei 66,5 kDa wird vom BSA erzeugt. Durch die starke Verdünnung der ANP-Formulierungen in den Spuren (3) und (4) ist eine Aussage über das freie, ungebundene BSA sowie die Verunreinigungen durch Serumproteine in diesen ANP-Formulierungen nicht möglich. Die ANP-Formulierung in Spur (5) mit DMEM und 10 % FCS in der äußeren Phase verfälscht die Aussage über das freie BSA, da dieses ebenfalls im FCS enthalten ist. Die FCS-freie ANP-Formulierung in Spur (6) hingegen kann für eine Aussage zum freien BSA herangezogen werden. Hier zeigt sich, dass unter 0,2 mg/ml an freiem BSA in der ANP-Formulierung vorhanden ist und damit über 75 % des BSA bei der Bildung der ANP beteiligt war, welche vom Gel abgetrennt wurden. Das Fehlen von Serumproteinen in der Spur (6) lässt außerdem darauf schließen, dass diese ebenfalls bei der Bildung der ANP beteiligt sind. Da beim Austausch der äußeren Phase nur das Ethanol durch Destillation abgetrennt wurde, sollte dies keinen Einfluss auf den Anteil an freiem BSA oder anderen Serumproteinen haben. Die Taschen ohne ANP in Spur (2) und (7 – 10) zeigen keine Blaufärbung, was dafür spricht, dass sich in diesen Taschen kein BSA mehr befindet und nur die ANP vom Gel zurückgehalten wurden.

4.2.1.2 Quervernetzung durch Temperatur

Nachdem im letzten Kapitel der Fokus auf dem Ausgangsmaterial für die ANP lag, soll in diesem Kapitel der Einfluss der thermischen Aushärtung während der Herstellung untersucht werden. Dafür wird die Partikelgröße, die Breite der Größenverteilung und das Zeta-Potential der ANP untersucht. Oftmals werden die nach der Desolvatation entstehenden Albumin-Agglomerate mit Glutaraldehyd stabilisiert, wodurch es zu einer Quervernetzung der BSA-Aminogruppen kommt. Dieses Verfahren bringt allerdings die im Theoriekapitel 2.2.2.1 beschriebenen Nachteile mit sich, weshalb als alternative Methode die thermische Aushärtung bei 60 °C verwendet wurde. Bei dieser thermischen Quervernetzung kommt es anstelle der chemischen Quervernetzung von Aminogruppen zu Denaturierungsvorgängen, was zu einem Verknäulen der einzelnen ANP führt.

Quervernetzung in min	Z-Mittel \pm SD in nm	PDI	Zeta-Potential \pm SD in mV
0	94,02 \pm 0,68	0,07	−37,20 \pm 1,51
30	99,25 \pm 1,13	0,08	−36,63 \pm 0,90
60	91,80 \pm 1,24	0,07	−36,87 \pm 0,81
90	88,59 \pm 0,71	0,09	−34,67 \pm 0,47
120	92,48 \pm 0,21	0,07	−33,80 \pm 0,36

Tabelle 4.2: Zeitlicher Einfluss der thermischen Quervernetzung bei 60 °C auf die Partikelgröße und das Zeta-Potential der ANP (n = 3).

In Tabelle 4.2 ist der Einfluss der thermischen Quervernetzung über die Zeit dargestellt. Die Partikelgrößenbestimmung erfolgte durch dynamische Lichtstreuung (DLS) (siehe Methodenkapitel 3.2.4.4.1). Diese Methode liefert als Größen das Z-Mittel, welches als Maß für die Partikelgröße dient, und den Polydispersitätsindex (PDI), der die Breite der Partikelverteilung angibt. Für die Beurteilung der Abstoßungskräfte der Partikel untereinander wurde zusätzlich das Zeta-Potential bestimmt. Die Messgrößen Z-Mittel, PDI und Zeta-Potential sind in Kapitel 3.2.4.4.1 ausführlich definiert.

Die Daten in Tabelle 4.2 zeigen, dass das Z-Mittel während des zweistündigen Aushärtens um $\bar{x} = 93$ nm schwankte. Der PDI lag im Mittel bei 0,07, was für eine

monomodale Partikelgrößenverteilung spricht. Das Zeta-Potential sank über die Zeit von anfänglich $-37,2$ mV auf nach 120 Minuten $-33,8$ mV.

Diskussion

Wie im Theoriekapitel 2.2.2.1 beschrieben, hängt die wärmeinduzierte Entfaltung der BSA-Moleküle und die dadurch auftretende Aggregation unter anderem von der Temperatur, der Temperatureinwirkungsdauer, dem pH-Wert und der Proteinkonzentration ab. Da die Proteinkonzentration mit $0,8$ mg/ml, der pH-Wert mit $7,0$ und die Temperatur mit 60 °C konstant waren, hätte eine Partikelgrößenveränderung hauptsächlich auf die Temperatureinwirkungsdauer zurückgeführt werden können.

Die Dauer der Aushärtung hat, wie Tabelle 4.2 zeigt, allerdings keinen Einfluss auf die Partikelgröße der ANP. Durch die thermische Behandlung veränderte sich die Partikelgröße der ANP nur um $1,5$ nm, was noch fast innerhalb der Standardabweichung der gemessenen Werte liegt. Die Temperatur von 60 °C ist nach Borzova et. al auch zu niedrig, um das BSA vollständig zu entfalten und dadurch einen bedeutenden Einfluss auf die Partikelgröße der ANP auszuüben [85].

Das Zeta-Potential der ANP ist stark vom pH-Wert der äußeren Phase abhängig und liegt bei einem pH-Wert von 1 bei 40 mV und bei einem pH-Wert von 13 bei -40 mV [126]. Der pH-Wert der wässrigen BSA-Lösung lag bei $7,0$, was den Angaben des Hersteller-Produktblattes entspricht (vergleiche Kapitel 3.1.2.1). Nach der ethanolischen Desolvation lag der pH-Wert bei $8,4$ und blieb auch während der Quervernetzung unverändert. Wie aus der DIN EN 15490 hervorgeht, ist die Bestimmung des absoluten pH-Wertes allerdings nur in wässrigen Medien möglich [127]. Bei weniger als 5 % Wasser ergibt sich eine ethanolische pH-Skala von 1 bis ca. 20, was bedeutet, dass der neutrale Bereich bei einem pH-Wert von etwa 10 liegt. In Anbetracht der Ethanolkonzentration von 84 Vol.-% in den ANP-Formulierungen ist eine Erhöhung des pH-Wertes zu erwarten, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sich die Wasserstoffionen-Aktivität während der Quervernetzung nicht verändert hat.

Das Zeta-Potential von -40 mV ist in diesem Fall also nicht auf den pH-Wert, sondern auf die veränderte ethanolische äußere Phase zurückzuführen. Das negative Zeta-

Potential deutet auf eine Denaturierung des BSA und damit einen Verlust der tertiären Faltung hin. Diese erfolgte wahrscheinlich direkt bei der Zugabe des Desolvationsreagenzes Ethanol, welches durch eine Störung der Wasserstoffbrückenbindungen und den hydrophoben Wechselwirkungen die ursprüngliche Proteinform veränderte. Für stabile disperse Systeme wird ein Betrag des Zeta-Potentials von > 50 mV angestrebt, da die elektrostatischen Abstoßungseffekte der Partikel dann ausreichend groß sind, um Agglomerationen zu minimieren.

Die erhöhte Tendenz zur Agglomeration in den folgenden Kapiteln könnte dementsprechend durch das verringerte, nach der thermischen Aushärtung vorliegende Zeta-Potential von -34 mV erklärt werden. Diese ungewollte Agglomeration von ANP wurde auch von Jun et. al. beschrieben [128]. Dort werden Albumin-Partikel unterschiedlicher Größe auf ihre Resuspendierbarkeit nach 24 Stunden untersucht, wobei die kleinsten Partikel mit 100 nm Größe die stabilsten Formulierungen bildeten.

4.2.1.3 Beladungszeitpunkte

Die ANP lassen sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit HYP-DCHA beladen. Untersucht wurde die Beladung *vor der Zugabe des Desolvationsreagenz Ethanol* [HvE], *mit der Zugabe von Ethanol* [HmE], *nach der Zugabe von Ethanol* [HnE] und *nach der Quervernetzung* [HnQ] (vergleiche Tabelle 3.2 im Methodenkapitel 3.2.3.1 auf Seite 55). Des Weiteren wurde für Experimente in der Zellkultur die äußere, ethanolische Phase nach der Beladung gegen eine isotone Trehaloselösung ausgetauscht.

Der Einfluss dieser vier Beladungszeitpunkte und der unterschiedlichen äußeren Phasen auf die Partikelgröße ist in Tabelle 4.3 aufgelistet. Da die geringen Mengen an HYP-DCHA für jeden Beladungszeitpunkt neu eingewogen wurden, schwanken die Konzentrationen zwischen $5,7$ und $8,4$ $\mu\text{mol/l}$. Bei den ANP-Formulierungen mit Ethanol als äußere Phase liegt das Z-Mittel bei $\bar{x} = 87$ nm, mit Ausnahme des Beladungszeitpunktes [HnE]. Hier liegt das Z-Mittel mit 107 nm knapp 20 %-Punkte über den Werten der anderen Beladungszeitpunkte. Angemerkt sei außerdem die im Vergleich zu den anderen Formulierungen um ca. 36 % erhöhte HYP-DCHA-Beladung ($8,4$ $\mu\text{mol/l}$ gegenüber $\bar{x} = 6,2$ $\mu\text{mol/l}$) beim Beladungszeitpunkt [HnE]. Der PDI von

Beladungs- zeitpunkt	Beladung in $\mu\text{mol/l}$	ÄP Ethanol		ÄP Trehalose	
		Z-Mittel \pm SD in nm	PDI	Z-Mittel \pm SD in nm	PDI
unbeladen	-	88,23 \pm 0,47	0,07	97,24 \pm 0,45	0,07
HvE	6,8	89,99 \pm 1,55	0,11	82,86 \pm 0,61	0,13
HmE	5,7	86,49 \pm 0,24	0,08	105,40 \pm 0,10	0,07
HnE	8,4	106,60 \pm 1,22	0,06	121,87 \pm 1,19	0,07
HnQ	6,0	85,10 \pm 0,72	0,06	106,90 \pm 0,82	0,07

Tabelle 4.3: Einfluss der Beladungszeitpunkte auf die Partikelgröße der ANP bei unterschiedlichen äußeren Phasen (n = 3, ÄP: Äußere Phase).

$\leq 0,1$ ergibt für alle Proben eine monomodale Partikelgrößenverteilung.

Das Z-Mittel der trehalosehaltigen Formulierungen ist im Durchschnitt um 16 % größer als das der ethanolischen Formulierungen; mit Ausnahme des Wertes bei [HvE]. Die trehalosehaltigen Formulierungen wurden durch Austausch der äußeren ethanolischen Phase aus den ethanolischen Formulierungen hergestellt, weshalb erneut das Z-Mittel des Beladungszeitpunktes [HnE], im Vergleich zu den anderen Beladungszeitpunkten, erhöht ist. Die Standardabweichung des Z-Mittels sank bei den meisten Formulierungen nach dem Phasenaustausch. Der PDI liegt mit Ausnahme der [HvE]-Formulierung bei 0,07.

Diskussion

Die Mehrzahl der Beladungszeitpunkte wirkt sich nicht signifikant auf die Partikelgröße aus. Entsprechend dem Z-Mittel von $\bar{x} = 87$ nm bei den ethanolischen ANP-Formulierungen tritt erst bei einem Z-Mittel von ≥ 98 nm statistische Signifikanz ein (Berechnung siehe Kapitel 3.2.1). Dies liegt vor allem an der unvermeidbaren Streuung der Partikelgröße während der Herstellung. Dementsprechend unterscheidet sich ausschließlich der Beladungszeitpunkt [HnE] mit der höheren HYP-DCHA-Beladung in der Partikelgröße signifikant von den anderen Beladungszeitpunkten. Da die [HnE]-Formulierungen allerdings zufallsbedingt eine um ca. 36 % erhöhte HYP-DCHA-Konzentration aufweisen, kann keine eindeutige Korrelation mit dem Beladungszeit-

punkt [HnE] prognostiziert werden. Der Einfluss der HYP-DCHA-Konzentration auf das Z-Mittel wird deshalb im nächsten Kapitel 4.2.1.4 gesondert untersucht.

Der Austausch der äußeren Phase scheint ebenfalls einen Einfluss auf die Partikelgröße zu haben. Im Schnitt ist diese nach dem Austausch von Ethanol mit einer Trehaloselösung um 16 nm angestiegen. Da bei der Partikelgrößenbestimmung mit der dynamischen Lichtstreuung der hydrodynamische Durchmesser der ANP bestimmt wird, ist durch den Phasenwechsel eine Vergrößerung der Hydrathülle denkbar und auch ein Anschwellen der ANP durch Wassereinlagerung in der BSA-Hülle wäre möglich. Das Anschwellen der ANP in unterschiedlichen äußeren Phasen wurde auch schon für verschiedene ethanolische und wässrige ANP-Formulierungen in der Literatur beschrieben [129].

Eine weitere Erklärung für den Größenzuwachs ist die Agglomeration der ANP beim Austausch der äußeren Phase. Für den Phasenaustausch wurde zuerst die neue, wässrige Trehaloselösung zur ethanolhaltigen ANP-Formulierung hinzugegeben und das Ethanol anschließend mit einem Rotationsverdampfer aus der ANP-Formulierung abdestilliert (siehe Kapitel 3.2.3.1). Ein entscheidender Prozessparameter ist dabei der zu wählende Unterdruck. Die Destillation wurde bei einem relativ niedrigen Unterdruck von 170 mbar und einer Temperatur von 40 °C gestartet, da die BSA-haltigen ANP-Formulierungen, wie die meisten Proteine, bei schneller Destillation bei erhöhter Gasbildung zu starker Schaumbildung neigen [130]. Erst als der Großteil des Ethanols verdampft war, wurde der Unterdruck auf 80 mbar erniedrigt. Es wurde dabei bewusst ein Druck deutlich unterhalb von 178 mbar, dem Dampfdruck von Ethanol bei 40 °C, gewählt, damit sichergestellt werden konnte, dass das gesamte Ethanol aus der ANP-Formulierung abgetrennt wurde. Da bei einem Druck von 80 mbar und einer Temperatur von 40 °C auch ein Teil des Wassers aus der neuen äußeren Trehalose-Phase verdampft, kann mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass auch das gesamte Ethanol verdampft ist. Der Wasserverlust wurde anschließend wieder mit bidestilliertem Wasser gravimetrisch ergänzt. Dieses Vorgehen hat den Nachteil, dass nach der Destillation des Ethanols und dem zusätzlichem Wasserverlust der neuen äußeren Phase das Gesamtvolumen der ANP-Formulierung kurzzeitig um etwa 5 % verringert wird. Dadurch wird die Agglomeration der ANP

begünstigt, da das Platzangebot für die Partikel kurzzeitig verringert wird (siehe vorheriges Kapitel 4.2.1.2). Durch das unvermeidliche Aufschäumen der Formulierung bei der Ethanol-Destillation ist der Prozess des Phasenaustausches schwierig zu steuern und führte teilweise auch zu irreversiblen ANP-Agglomerationen von über 200 nm. Dies lässt auf eine Agglomeration von mindestens zwei ANP miteinander schließen. Die Ergebnisse dieser agglomerierten ANP-Formulierungen wurden aufgrund des systematischen Fehlers verworfen.

Da die Partikelgrößen der ANP-Formulierungen durch den Phasenaustausch im Mittel nur um 19 % angestiegen sind, ist es unwahrscheinlich, dass hierbei ebenfalls viele ANP miteinander agglomeriert sind. Wahrscheinlicher ist die Anlagerung von freien, noch nicht in die ANP eingebauten BSA-Molekülen und das weiter oben erwähnte Anschwellen der ANP. Durch die erhöhte Temperatur von 40 °C während der Destillation ist außerdem die fortschreitende Denaturierung des BSA begünstigt, wodurch sich einzelne, lange Molekülketten miteinander verknäulen können und ebenfalls größere Agglomerate entstehen. Wie in den folgenden Kapiteln gezeigt wird, ist eine Kombination der hier diskutierten Effekte für die größeren Partikel nach dem Phasenaustausch am wahrscheinlichsten.

4.2.1.4 HYP-DCHA-Konzentration

Die Tabelle 4.4 zeigt den Einfluss unterschiedlicher HYP-DCHA-Beladungen auf das Z-Mittel. Die ANP-Formulierungen mit den beiden äußeren Phasen Ethanol und Trehalose wurden vor dem Desolvatationsreagenz [HvE] mit HYP-DCHA beladen. Die ANP-Formulierungen mit DMEM hatten als Beladungszeitpunkt die Beladung nach der Quervernetzung [HnQ]. Der Phasenaustausch erfolgte jeweils nach der Beladung (siehe Methodenkapitel 3.2.3.1). Da die Beladungszeitpunkte wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Partikelgröße haben (siehe Kapitel 4.2.1.3), sollte eine Veränderung der Partikelgröße auf die unterschiedlichen HYP-DCHA-Konzentrationen zurückzuführen sein.

Das Z-Mittel bei den ANP-Formulierungen mit Ethanol als äußere Phase liegt wie in den vorangegangenen Experimenten wieder bei ca. 90 nm (\bar{x} = 88 nm), allerdings

Beladung in $\mu\text{mol/l}$	ÄP Ethanol		ÄP Trehalose		ÄP DMEM	
	Z-Mittel \pm SD in nm	PDI	Z-Mittel \pm SD in nm	PDI	Z-Mittel \pm SD in nm	PDI
0,0	86,32 \pm 1,54	0,08	97,24 \pm 0,45	0,07	105,37 \pm 0,85	0,12
0,3	93,55 \pm 0,26	0,06	84,73 \pm 0,73	0,06	110,87 \pm 1,26	0,13
1,0	86,78 \pm 0,18	0,08	88,13 \pm 0,12	0,06	105,03 \pm 1,53	0,13
2,0	80,05 \pm 0,53	0,08	76,31 \pm 0,25	0,08	105,73 \pm 0,50	0,11
5,0	101,43 \pm 1,00	0,07	90,35 \pm 0,32	0,06	121,80 \pm 0,36	0,14
10,0	80,14 \pm 1,33	0,07	77,11 \pm 1,08	0,08	126,03 \pm 0,81	0,21

Tabelle 4.4: Einfluss der HYP-DCHA-Konzentration auf die Partikelgröße der ANP.

Der Beladungszeitpunkt der ethanolischen und trehalosehaltigen Formulierungen war vor dem Desolvatationsreagenz Ethanol [HvE] sowie bei den ANP-Formulierungen mit DMEM nach der Quervernetzung [HnQ] ($n = 3$, ÄP: Äußere Phase).

schwanken die Werte zwischen 80 und 101 nm. Bei den ANP-Formulierungen mit der isotonen Trehaloselösung als äußere Phase liegen die Z-Mittel zwischen 77 und 97 nm und bei den Formulierungen mit DMEM als äußere Phase bei ≥ 105 nm. Der PDI der DMEM-haltigen ANP-Formulierungen ist mit $\geq 0,11$ im Durchschnitt um den Faktor 1,98 größer als der PDI der ethanolischen und trehalosehaltigen ANP-Formulierungen, die zwischen 0,06 und 0,08 liegen.

Diskussion

Es konnte kein Anstieg der Partikelgröße in Zusammenhang mit der HYP-DCHA-Konzentration festgestellt werden. Auffällig sind die Partikelgrößen der HYP-DCHA-Beladung mit 5 $\mu\text{mol/L}$ bei den ethanolischen ANP-Formulierungen und die beiden HYP-DCHA-Konzentrationen von 5 und 10 $\mu\text{mol/L}$ bei den ANP-Formulierungen mit DMEM als äußere Phase. Wie im letzten Kapitel beschrieben, führt der Austausch der äußeren Phase manchmal zum Aufschäumen der Formulierungen während der Destillation und durch weitere Agglomerationseffekte zu systematischen Fehlern, welche die erhöhten Z-Mittel bei einzelnen HYP-DCHA-Konzentrationen erklären könnten.

Eventuell verstärkt eine höhere HYP-DCHA-Konzentration diese Effekte zusätzlich. Mit statistischen Tests (vergleiche Kapitel 3.2.1) konnte keine Korrelation zwischen der HYP-DCHA-Konzentration und dem Z-Mittel festgestellt werden (vergleiche auch nächstes Kapitel 4.2.1.5).

Da die Formulierungen mit Trehalose und DMEM als äußere Phasen nicht aus der in Tabelle 4.4 dargestellten ethanolischen ANP-Formulierung hergestellt wurden, können die Partikelgrößen nicht wie im vorherigen Kapitel 4.2.1.3 direkt miteinander verglichen werden, weshalb der Einfluss der unterschiedlichen äußeren Phasen auf das Z-Mittel hier nicht beurteilt werden kann.

Um das Dicyclohexylammonium-Salz (DCHA) als weiteren Einflussfaktor für unterschiedliche Partikelgrößen auszuschließen, wurden die Versuche aus Tabelle 4.4 auch mit dem reinen Salz ohne Hyperforin durchgeführt. In allen Konzentrationen von 0,3 bis 10 $\mu\text{mol/l}$ konnte dabei ebenfalls kein Einfluss auf die Partikelgröße festgestellt werden. Mit Ethanol als äußere Phase konnte ein durchschnittliches Z-Mittel von $109,63 \pm 4,06 \text{ nm}$ mit einem PDI von 0,14 ermittelt werden. Mit Trehalose als äußere Phase lag das Z-Mittel bei $92,14 \pm 2,74 \text{ nm}$ und der PDI bei 0,06. Ungewöhnlicherweise waren diesmal die Formulierungen mit Trehalose im Durchschnitt kleiner als die Ausgangsformulierungen mit Ethanol. Dieses Phänomen wurde allerdings nicht weiter untersucht, da die Zielsetzung, den Einfluss des Salzes DCHA auf die Partikelgröße der ANP-Formulierungen zu untersuchen, erfüllt ist.

4.2.1.5 ANP-Konzentration

Als vorletzter Einflussfaktor auf die Partikelgröße wurde der Einfluss unterschiedlicher ANP- bzw. BSA-Konzentration untersucht, die bei allen vorherigen Formulierungen 0,8 mg/ml BSA betrug. Hierfür wurden unterschiedliche Volumina der unbeladenen ANP-Formulierung für 10 min mit einer HYP-DCHA-Stammlösung inkubiert [HnQ]. Die ANP-Konzentration wurde anschließend durch das Volumen der neuen äußeren Phase beim Phasenaustausch eingestellt. Hierbei wurde die ethanolische Phase mit einem Zellkulturmedium ersetzt. Auftretende Massenverluste beim Phasenaustausch wurden mit bidestilliertem Wasser ergänzt (vergleiche Diskussion in Kapitel 4.2.1.3).

Die HYP-DCHA-Beladungen in den Formulierungen betrugen in der Regel 1 $\mu\text{mol/l}$ und in Ausnahmen 5 sowie 10 $\mu\text{mol/l}$.

Beladung in $\mu\text{mol/l}$	BSA-Konz. in mg/ml	Z-Mittel \pm SD in nm	PDI
1	0,2	100,77 \pm 0,38	0,19
1	0,8	108,57 \pm 0,61	0,13
1	1,4	119,53 \pm 0,91	0,12
1	2,0	194,47 \pm 2,85	0,25
1	2,6	145,70 \pm 1,14	0,16
1	3,2	151,90 \pm 0,66	0,19
5	0,8	112,80 \pm 0,72	0,13
5	1,6	118,93 \pm 0,23	0,10
10	0,8	111,13 \pm 0,32	0,16
10	1,6	104,57 \pm 0,60	0,09

Tabelle 4.5: Einfluss der BSA-Konzentrationen der ANP-Formulierungen und der HYP-DCHA-Beladung auf die Partikelgröße der ANP für den Beladungszeitpunkt nach der Quervernetzung [HnQ], äußere Phase DMEM (n = 3).

Da die Konzentration an ANP in der Formulierung nur rechnerisch ermittelt werden kann, wird im folgenden immer die BSA-Konzentration der Formulierung angegeben, die sich indirekt auf die ANP-Konzentration bezieht. Die BSA-Konzentrationen der ANP-Formulierungen wurden, wie in Tabelle 4.5 dargestellt, in 0,6 mg/ml -Schritten von 0,2 auf 3,2 mg/ml BSA erhöht.

In Ergänzung zum vorherigen Kapitel werden in Tabelle 4.5 zusätzlich die Partikelgrößen von Formulierungen mit HYP-DCHA-Beladungen von 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ aufgelistet. Als ANP- bzw. BSA-Konzentrationen wurden für diese Formulierungen die Standardkonzentration von 0,8 und die doppelt so hohe Konzentration von 1,6 mg/ml gewählt.

Das Z-Mittel der mit 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA-beladenen Formulierungen stieg mit steigender ANP- bzw. BSA-Konzentration von 101 auf 152 nm an. Bei der HYP-DCHA-Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ konnte durch die Erhöhung der ANP- bzw. BSA-

Konzentration von 0,8 auf 1,6 mg/ml ebenfalls ein Anstieg von 6 nm beim Z-Mittel beobachtet werden. Bei 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA war bei steigender BSA-Konzentration ein Absinken des Z-Mittel um 7 nm zu beobachten. Die PDIs der einzelnen Formulierungen schwankten zwischen 0,09 und 0,25. Ein eindeutiger Trend bzw. eine Korrelation mit der ANP-Konzentration ist beim PDI nicht zu erkennen. Eine besonders große Partikelgröße resultierte bei einer Beladung von 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA und einer ANP- bzw. BSA-Konzentration von 2,0 mg/ml.

Diskussion

Ein Anstieg der ANP-Größe mit zunehmender ANP- bzw. BSA-Konzentration lässt sich auch in der Literatur wiederfinden [84]. Dort ist dieser Effekt für unterschiedliche BSA-Konzentrationen bei der ANP-Herstellung beschrieben. Erklärt wird der Größenzuwachs der ANP bei höheren BSA-Ausgangskonzentrationen durch eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit für elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen der BSA-Moleküle untereinander, welche die Agglomeration dieser begünstigen [82]. Im Unterschied zur Literatur ist in diesem Kapitel die BSA-Ausgangskonzentration bei der ANP-Herstellung konstant gewesen. Erst durch das Hinzufügen von unterschiedlichen Volumina der neuen äußeren Phase und dem anschließenden Abdestillieren des Ethanols werden die benötigten ANP-Konzentration eingestellt. Durch die indirekte Erhöhung der BSA-Konzentration infolge der gesteigerten ANP-Konzentration steigt auch hier die Wahrscheinlichkeit für elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen der BSA-Moleküle untereinander an, da das Platzangebot pro ANP sinkt. Das dadurch beobachtete Partikelwachstum bei aufsteigenden ANP-Konzentrationen bestätigt das Agglomerationsverhalten der ANP aus den vorangegangenen Kapiteln, was zur Verschiebung des Z-Mittels hin zu größeren Werten führt (vergleiche Kapitel 4.2.1.3). Die Schwankungen des PDI machen deutlich, dass es sich beim Phasenaustausch um keinen gut steuerbaren Prozess handelt. Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, ist der Austausch der äußeren Phase nicht trivial. Die Formulierungen mit einer Beladung von 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA und einer ANP- bzw. BSA-Konzentration von 2,0 mg/ml besaßen mit fast 200 nm ein circa doppelt so hohes Z-Mittel wie die Formulierungen mit 0,2 mg/ml BSA. Denkbar ist daher die Teilagglomeration.

meration von zwei ANP miteinander, wofür auch die hohe Standardabweichung und der PDI von 0,25 sprechen würden.

Wie schon im vorherigen Kapitel 4.2.1.4 beschrieben, kann auch hier keine Korrelation zwischen unterschiedlichen HYP-DCHA-Beladungen und dem Z-Mittel festgestellt werden (vergleiche Kapitel 3.2.1). Die Partikelgröße nimmt zwar mit steigender HYP-DCHA-Beladung zu, allerdings nur bei den Formulierungen mit einer ANP- bzw. BSA-Konzentration von 0,8 mg/ml. Bei der höheren ANP- bzw. BSA-Konzentration von 1,6 mg/ml verhält sie sich invers und nimmt mit zunehmender HYP-DCHA-Beladung ab. Aus diesem Grund muss bei der aktuellen Datenlage von einem zufälligen Effekt ausgegangen werden.

4.2.1.6 Lagerstabilität der Formulierungen

Die Veränderung der Partikelgröße von ANP-Formulierungen mit unterschiedlichen HYP-DCHA-Beladungen über 2 Wochen ist in Tabelle 4.6 dargestellt.

Beladung in $\mu\text{mol/l}$	Zeit: 0 Tage		Zeit: 15 Tage	
	Z-Mittel \pm SD in nm	PDI	Z-Mittel \pm SD in nm	PDI
0	105,37 \pm 0,85	0,12	106,87 \pm 0,38	0,12
1	105,03 \pm 1,53	0,13	105,83 \pm 1,36	0,13
2	105,73 \pm 0,50	0,11	104,73 \pm 0,47	0,13
5	121,80 \pm 0,36	0,14	116,47 \pm 1,91	0,14
10	126,03 \pm 0,81	0,21	122,30 \pm 0,66	0,21

Tabelle 4.6: Einfluss der Lagerdauer auf die Partikelgröße der ANP für den Beladungszeitpunkt nach der Quervernetzung [HnQ] mit DMEM als äußere Phase (n = 3, Lagertemperatur 8 °C).

Die Beladung wurde nach der Quervernetzung [HnQ] durchgeführt und im Anschluss die äußere Phase gegen DMEM ausgetauscht. Zur Erhöhung der Stabilität wurden die Formulierungen bei der verminderten Temperatur von 8 °C gelagert. Die Veränderungen des Z-Mittel über die Zeit sind marginal und liegen im Bereich von 1 bis 5 nm.

Die Veränderungen der Partikelgröße über einen Zeitraum von 3 Wochen von weiteren ANP-Formulierungen mit unterschiedlichen HYP-DCHA-Beladungen sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Die Lagertemperatur betrug wieder 8 °C. Der Beladungszeitpunkt der Formulierungen war nach der Quervernetzung [HnQ], aber die äußere Phase bestand diesmal aus DMEM mit einem Zusatz von 10 % FCS. Bisher wurde die äußere ethanolische Phase immer gegen eine isotone Trehaloselösung oder reines DMEM ausgetauscht. Für Experimente in der Zellkultur (ab Kapitel 4.4) ist für bestimmte Zelltypen allerdings der Zusatz von Fetalem Kälberserum (FCS) nötig, welches als einen der Hauptinhaltsstoffe BSA enthält. Ausführlich wird dieses Medium in den Kapiteln 3.1.4 und 4.3.5 beschrieben.

Alle Formulierungen aus Tabelle 4.7 weisen im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten ein erhöhtes Z-Mittel an Tag 0 auf. Über 3 Wochen blieb die Partikelgröße in den ANP-Formulierungen mit 0 µmol/l HYP-DCHA nahezu konstant.

Zeit in Tagen	HYP-DCHA-Beladung in µmol/l					
	HYP-DCHA: 0		HYP-DCHA: 1		HYP-DCHA: 10	
	Z-Mittel ± SD in nm	PDI	Z-Mittel ± SD in nm	PDI	Z-Mittel ± SD in nm	PDI
0	136,13 ± 1,37	0,13	146,00 ± 0,95	0,20	171,90 ± 2,36	0,24
7	136,70 ± 1,93	0,13	131,70 ± 0,53	0,16	154,97 ± 1,10	0,19
14	133,00 ± 0,50	0,12	129,77 ± 0,25	0,14	150,97 ± 1,54	0,18
21	137,83 ± 1,78	0,12	132,53 ± 0,95	0,13	153,33 ± 2,24	0,16

Tabelle 4.7: Einfluss der Lagerdauer auf die Partikelgröße der ANP für den Beladungszeitpunkt nach der Quervernetzung [HnQ], äußere Phase DMEM + 10 % FCS (n = 3, Lagertemperatur 8 °C).

Die Partikelgrößen der Formulierungen mit HYP-DCHA-Beladungen von 1 µmol/l wurden innerhalb der ersten Woche von 146 auf 132 nm etwas kleiner, blieben danach konstant und näherten sich damit den Formulierungen mit 0 µmol/l HYP-DCHA an. Die ANP-Formulierungen mit einer HYP-DCHA-Beladung von 10 µmol/l waren nach der ersten Woche um 17 nm kleiner, waren aber im Vergleich zu den anderen beiden Formulierungen mit einer HYP-DCHA-Beladung von 0 und 1 µmol/l nach 21 Tagen

um 16 bzw. 21 nm größer. Der PDI sank bei allen Formulierungen über die Zeit von 0,13 bis 0,24 auf 0,12 bis 0,16.

Diskussion

Die allgemein erhöhten Partikelgrößen der ANP-Formulierungen in Tabelle 4.7 können auf die höheren BSA-Konzentrationen zurückzuführen sein, die durch den FCS-Zusatz verursacht werden. Die freien BSA-Moleküle aus dem FCS erschweren außerdem den Phasenaustausch, da BSA zur Schaumbildung neigt. Denkbar ist auch, dass es während des Phasenaustauschs zu einer temporären Anlagerung der freien BSA-Moleküle an die ANP kommt. Da diese angelagerten BSA-Moleküle nicht mit den ANP quervernetzt sind, ist dieser Vorgang zum Teil reversibel. Dies erklärt, weshalb die Partikelgröße nach 7 Tagen bei manchen Formulierungen wieder sank und danach über mehrere Wochen in ihrer Größe stabil blieben. Weitere Einzeluntersuchungen ergaben, dass sich eine konstante Partikelgröße der ANP allgemein oft erst nach 24 Stunden einstellt.

Durch die Sedimentation der ANP kann eine fehlerhafte Vermessung des nicht repräsentativen Überstandes mit einer kleineren Partikelgrößenverteilung resultieren. Dies wird durch eine vorherige Durchmischung der Formulierungen vor den Messungen mit einem Vortexmischer ausgeschlossen.

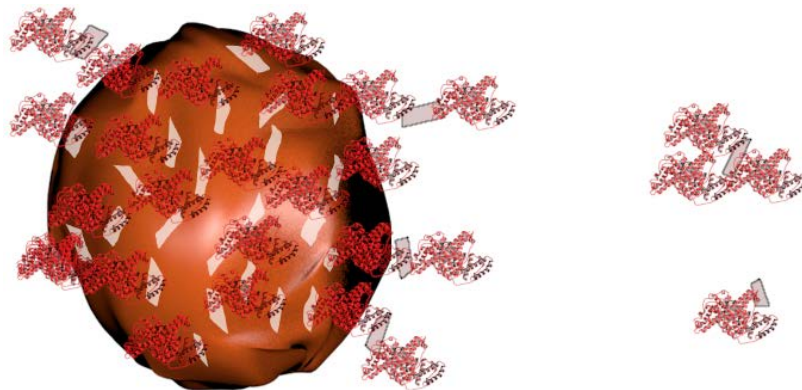


Abbildung 4.5: Nicht maßstabsgetreue, modellhafte Vorstellung der Interaktion von HYP-DCHA (helle Flächen) mit einem ANP (Kugel) und freiem BSA (Albumin-Strukturen).

In den vorangegangenen Kapiteln konnte kein Einfluss der HYP-DCHA-Beladung auf die ANP-Größe nachgewiesen werden, weshalb die erhöhten Partikelgrößen bei der HYP-DCHA-Beladung von 10 $\mu\text{mol/l}$ auch auf einem zufälligen Fehler basieren könnten. Allerdings ist hier zum ersten Mal ein Zusatz von FCS in den Formulierungen enthalten, weshalb das HYP-DCHA nicht nur mit den ANP wechselwirkt, sondern auch mit den freien BSA-Molekülen in Wechselwirkung treten kann.

Diese Wechselwirkung wird speziell beim Phasenaustausch begünstigt, wo es zu einer Affinitätssteigerung der HYP-DCHA-Moleküle zu den BSA-Molekülen kommt. Da HYP-DCHA in der neuen wässrigen äußeren Phase im Gegensatz zur ethanolischen äußeren Phase nur sehr schwer löslich ist (vergleiche die folgenden Kapitel ab 4.2.2.1), steigen die Interaktionen mit den ANP bzw. BSA-Molekülen. Eine modellhafte Vorstellung ist in Abbildung 4.5 zu sehen. Hier beschränken sich die Wechselwirkungen nicht nur auf die ANP, an das sich das HYP-DCHA ggf. zusammen mit freien BSA-Molekül aus dem FCS anlagert (linke Bildhälfte). Vielmehr geht das HYP-DCHA direkt Wechselwirkungen mit freien BSA-Moleküle aus dem FCS ein (rechte Bildhälfte). Dies bedeutet, dass es sein kann, dass nur ein Teil des HYP-DCHA mit den ANP in Wechselwirkung steht und der andere Teil sich mit dem freien BSA in der äußeren Phase befindet. Bei einer Anlagerung des HYP-DCHA wie in der linken Bildhälfte gezeigt, würde die Partikelgröße abhängig von der HYP-DCHA-Beladung beeinflusst werden. Bis sich ein Gleichgewicht zwischen den Wechselwirkungen eingestellt hat, kann die Partikelgröße dementsprechend schwanken.

Dieser Erklärungsansatz berücksichtigt, weshalb es im Vergleich mit den vorherigen Kapiteln nur bei den ANP-Formulierungen aus Tabelle 4.7 zu einem signifikanten Anstieg der Partikelgröße kam. Wie in Kapitel 4.2.1.1 gezeigt wurde, war der Anteil an freiem BSA in den vorangegangenen ANP-Formulierungen sehr niedrig, wodurch bis jetzt keine Korrelation zwischen der HYP-DCHA-Beladung und der ANP-Größe festgestellt werden konnte. Zur Überprüfung dieser Theorie könnte das freie BSA aus den FCS-haltigen ANP-Formulierungen vor dem Phasenaustausch durch eine Ultrafiltration mit Zentrifugenröhrchen (Vivaspins[®], siehe Kapitel 3.2.4.7.3) abfiltriert werden und anschließend erneut die Partikelgröße bestimmt werden. Für den praktischen Einsatz würde die Bestätigung dieser Theorie allerdings keine Vorteile bringen,

da das freie BSA für das Zellwachstum in der Zellkultur benötigt wird und daher unabdingbar ist.

4.2.2 HYP-DCHA-Stabilität

Nachdem in den vorherigen Kapiteln die Einflussfaktoren für die Partikelgröße untersucht wurden, wird folgend die Stabilität des HYP-DCHA in den ANP-Formulierungen analysiert. Konkret werden dabei die Beladungszeitpunkte, die Konzentrationen der HYP-DCHA-Beladung und der Einfluss der ANP-Konzentration betrachtet. Die Fragestellungen dahinter lauten: Können die ANP das empfindliche HYP-DCHA stabilisieren und wenn ja, bis zu welcher HYP-DCHA-Beladung ist dies möglich? Des Weiteren soll geklärt werden, in wieweit die stabilisierenden Eigenschaften der ANP von der ANP-Konzentration abhängig sind. Mit der anschließenden Beurteilung der Lagerstabilität der ANP-Formulierungen wird das Kapitel abgeschlossen. Alle Aussagen zur Stabilität des HYP-DCHA beziehen sich auf die HPLC-Methode aus Kapitel 3.2.4.7 ab Seite 76. Als Maß für die Stabilität wird die HYP-DCHA-Wiederfindung verwendet. Bei einer nahezu vollständigen Wiederfindung der eingesetzten HYP-DCHA-Konzentration wird von einer stabilen Formulierung ausgegangen.

4.2.2.1 Beladungszeitpunkte und HYP-DCHA-Lokalisation

Wie schon in Kapitel 4.2.1.3 beschrieben, können die ANP zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit HYP-DCHA beladen werden. Der Einfluss dieser Beladungszeitpunkte ist in Tabelle 4.8 dargestellt. Die äußeren Phasen der ANP-Formulierungen bestanden aus Ethanol oder für die Zellkulturexperimente aus einer isotonen Trehaloselösung (siehe Kapitel 2.2.2.1). Der Austausch der äußeren Phase erfolgte im Anschluss an die HYP-DCHA-Beladung.

Bei den ANP-Formulierungen mit Ethanol als äußeren Phase wurden $\bar{x} = 100,4\%$ des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden. Die Standardabweichungen lagen zwischen 1 und 7 %. Nach dem Austausch der ethanolischen Phase gegen eine wässrige

¹ Abkürzungen siehe Kapitel 3.2.3.1

4 Ergebnisse und Diskussion

Beladungs- zeitpunkte ¹	Beladung in $\mu\text{mol/l}$	HYP-DCHA-Wiederfindung \pm SD in %		
		ÄP Ethanol	ÄP EtOH w/o ANP	ÄP Trehalose
HvE	6,8	103,51 \pm 01,42	82,12 \pm 06,60	91,52 \pm 14,74
HmE	5,7	96,76 \pm 00,80	92,66 \pm N/A	94,28 \pm 15,97
HnE	8,4	101,86 \pm 05,38	95,14 \pm 01,77	96,36 \pm 03,94
HnQ	6,0	99,63 \pm 06,83	93,29 \pm 11,61	94,75 \pm 20,64

Tabelle 4.8: Einfluss der Beladungszeitpunkte auf die HYP-DCHA-Wiederfindung in ANP-Formulierungen mit unterschiedlichen äußeren Phasen. Zusätzlich ist die HYP-DCHA-Wiederfindung in der ethanolischen äußeren Phase nach Ultrafiltration, d.h. ohne ANP (w/o ANP) aufgeführt (n = 3, ÄP: Äußere Phase, N/A: nicht vorhanden).

trehalosehaltige Phase verringerte sich die HYP-DCHA-Wiederfindung im Mittel um 6 % auf 94,2 %. Die Standardabweichungen der ANP-Formulierungen mit Trehalose schwankten zwischen 4 und 21 % und damit deutlich stärker als die der ethanolischen Formulierungen.

Zur Beurteilung der Lokalisation des HYP-DCHA in den ANP-Formulierungen wurden die ANP durch Ultrafiltration mit einem Molecular Weight Cut Off (MWCO) von 100 000 Dalton von der äußeren Phase abgetrennt (siehe Methodenkapitel 3.2.4.7.3). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.8 in Spalte *ÄP EtOH w/o ANP* aufgelistet. Die analysierte HYP-DCHA-Konzentration in den äußeren ethanolischen Phasen betrug $\bar{x} = 90,8$ %. Für den Beladungszeitpunkt [HmE] konnte in zwei von drei Filtraten kein HYP-DCHA nachgewiesen werden, weshalb keine Standardabweichung angegeben ist (N/A). Die HYP-DCHA-Konzentrationen in den äußeren Phasen der trehalosehaltigen ANP-Formulierungen (ÄP Trehalose w/o ANP) wurden ebenfalls untersucht, sind allerdings nicht in der Tabelle 4.8 aufgeführt. Alle Werte lagen unterhalb der LOD (siehe Methodenkapitel 3.2.4.7), womit kein HYP-DCHA in den äußeren Phasen dieser Formulierungen nachgewiesen werden konnte.

Diskussion

Es zeigt sich in den HYP-DCHA-Wiederfindungen kein signifikanter Unterschied zwischen den Formulierungen, die nach der thermischen Quervernetzung [HnQ] beladen wurden, und den ANP-Formulierungen, die vor der thermischen Quervernetzung [HvE, HmE und HnE] mit HYP-DCHA beladen wurden. Der Temperatureinfluss von 60 °C über 2 Stunden hat demnach auch bei den beladenen ANP-Formulierungen keinen Einfluss auf die HYP-DCHA-Wiederfindung (vergleiche Kapitel 4.1).

Aufgrund der hohen HYP-DCHA-Wiederfindungen in den äußeren ethanolhaltigen Phasen (Spalte ÄP EtOH w/o ANP) von $\bar{x} = 90,8\%$ scheint das HYP-DCHA zum größten Teil in der äußeren Phase lokalisiert zu sein. Da HYP-DCHA in polaren Lösungsmitteln wie Wasser praktisch unlöslich ist, konnte in den äußeren Phasen der trehalosehaltigen ANP-Formulierungen (ÄP Trehalose w/o ANP) kein HYP-DCHA nachgewiesen werden.

In den trehalosehaltigen ANP-Formulierungen (Spalte ÄP Trehalose), also mit ANP, wurden nach dem Phasenaustausch im Mittel 94,2 % des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden, weshalb das HYP-DCHA nach dem Phasenaustausch noch in den Formulierungen enthalten gewesen sein muss. Demnach ist das HYP-DCHA entweder beim Phasenaustausch ausgefallen und hat sich erst bei der Gehaltsbestimmung im Fließmittel der HPLC-Analyse wieder gelöst oder es wechselwirkte nach dem Phasenaustausch mit den ANP und war demnach in der ANP-Phase lokalisiert. Für eine HYP-DCHA-Interaktion mit den ANP und damit einer Lokalisation in der ANP-Phase spricht, dass mikroskopisch keine HYP-DCHA-Präzipitate in der ANP-Formulierung nachgewiesen werden konnten. Weitere Begründungen für eine Interaktion mit den ANP werden in den folgenden Kapiteln ab Kapitel 4.2.2.2 diskutiert. Die hohen Standardabweichungen von bis zu 21 % bei den trehalosehaltigen ANP-Formulierungen (Spalte ÄP Trehalose) zeigt auch bei der HYP-DCHA-Wiederfindung die Schwierigkeiten beim nicht trivialen Austausch der äußeren Phase (vergleiche Partikelgrößenverteilung ab Kapitel 4.2.1.3).

4.2.2.2 Beladungskonzentration

Die Tabelle 4.9 zeigt die HYP-DCHA-Wiederfindung in ANP-Formulierungen mit unterschiedlich hohen HYP-DCHA-Beladungskonzentrationen.

Beladung in $\mu\text{mol/l}$	HYP-DCHA-Wiederfindung in %		
	ÄP Ethanol	ÄP Trehalose	ÄP DMEM
0,3	31,64	41,34	94,71
1,0	62,71	54,61	62,91
2,0	76,96	73,38	85,20
5,0	82,45	76,77	92,03
10,0	93,17	84,26	96,79

Tabelle 4.9: Einfluss unterschiedlicher HYP-DCHA-Beladungskonzentrationen auf die Wiederfindung des HYP-DCHA in ANP-Formulierungen. Der Beladungszeitpunkt der ANP-Formulierungen mit Ethanol und Trehalose war vor dem Desolvationsreagenz Ethanol [HvE], die ANP-Formulierung mit DMEM als äußeren Phase wurden nach der thermischen Quervernetzung [HnQ] beladen (n = 1, ÄP: Äußere Phase).

Die ANP-Formulierungen mit den äußeren Phasen Ethanol und Trehalose wurden vor dem Desolvationsreagenz [HvE] mit HYP-DCHA beladen. Die ANP-Formulierungen mit DMEM als äußeren Phase, welches für die Zellkulturexperimente benötigt wurde (siehe Kapitel 4.4), wurden nach der Quervernetzung [HnQ] mit HYP-DCHA beladen.

Auffällig sind die niedrigen HYP-DCHA-Wiederfindungen bei den ethanolhaltigen und trehalosehaltigen ANP-Formulierungen mit einer HYP-DCHA-Beladung von $0,3 \mu\text{mol/l}$. Außerdem wurde hier in der trehalosehaltigen ANP-Formulierung 30 % mehr HYP-DCHA wiedergefunden als in der ethanolhaltigen ANP-Formulierung und das, obwohl die trehalosehaltigen ANP-Formulierungen durch Austausch der äußeren Phase aus den ethanolhaltigen ANP-Formulierungen hergestellt wurden. Da nach dem Phasenaustausch nicht mehr HYP-DCHA in der Formulierung enthalten sein kann, sind diese beiden ANP-Formulierungen als „Ausreißer“ zu betrachten. Trotzdem

passen die Ergebnisse, wie sich weiter unten zeigt, prinzipiell zum Gesamtbild einer steigenden prozentualen HYP-DCHA-Wiederfindung bei steigender HYP-DCHA-Beladungskonzentration. Für die restlichen ethanolhaltigen ANP-Formulierungen ergaben sich damit HYP-DCHA-Wiederfindungen, welche im Schnitt um 7 % über denen der trehalosehaltigen ANP-Formulierungen lagen. Das Verhältnis zwischen den HYP-DCHA-Wiederfindungen der ethanolhaltigen und der trehalosehaltigen ANP-Formulierungen bestätigt die Ergebnisse aus dem vorherigen Kapitel 4.2.2.1.

Die HYP-DCHA-Wiederfindungen der nach der Quervernetzung mit DMEM als äußeren Phase hergestellten ANP-Formulierungen lagen im Mittel um 14 % über den trehalosehaltigen und entsprechend um 8 % über den ethanolhaltigen ANP-Formulierungen. Nicht untersucht wurden die HYP-DCHA-Wiederfindungen der DMEM-Formulierungen vor dem Phasenaustausch, weshalb auch nur die ersten beiden Tabellenspalten von Tabelle 4.9 direkt miteinander verglichen werden.

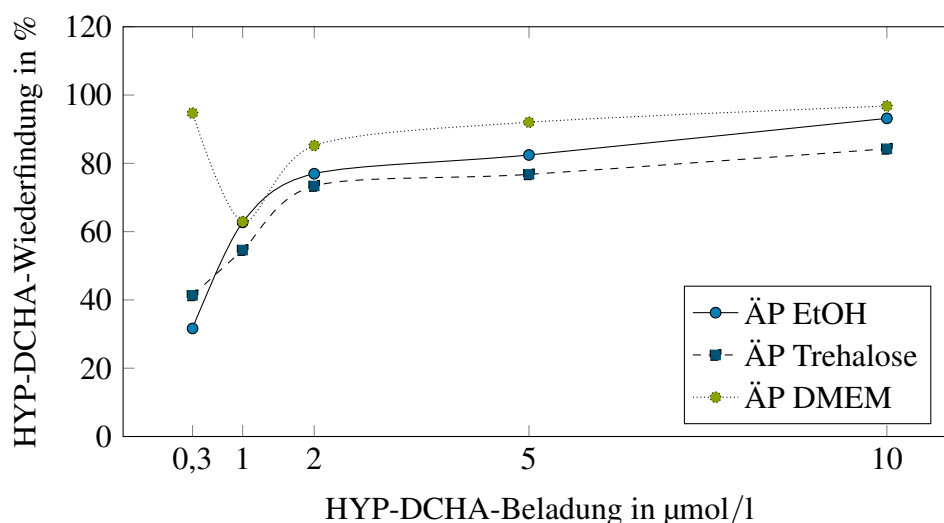


Abbildung 4.6: Grafischer Zusammenhang zwischen der HYP-DCHA-Wiederfindung und der Beladungskonzentration, Daten aus Tabelle 4.9.

Werden die Daten aus Tabelle 4.9 grafisch aufgetragen (Abbildung 4.6), dann zeigt sich ab einer HYP-DCHA-Beladung von $2 \mu\text{mol/l}$ bei allen drei Formulierungen ein nahezu linearer Bereich. Bei den ethanolhaltigen ANP-Formulierungen beträgt die Steigung des linearen Bereichs $2,03 \% \text{ WF}_{\text{HYP-DCHA}}$ pro $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA mit einem

Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,998$. Bei den trehalosehaltigen ANP-Formulierungen liegt die Steigung bei 0,67 % $WF_{HYP-DCHA}$ pro $\mu\text{mol/l HYP-DCHA}$ ($R^2 = 0,999$). Die DMEM-haltigen Formulierungen haben eine Steigung von 0,99 % $WF_{HYP-DCHA}$ pro $\mu\text{mol/l HYP-DCHA}$ ($R^2 = 0,903$). Zusammenfassend nimmt die wiedergefundene Konzentration an HYP-DCHA im linearen Bereich je nach Formulierung zwischen 0,67 und 2,03 % je vorhandenem $\mu\text{mol/l HYP-DCHA}$ zu.

Diskussion

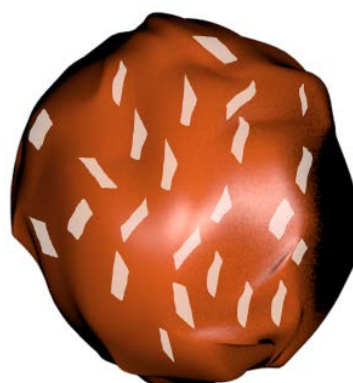
Die Ergebnisse aus Tabelle 4.9 suggerieren einen Einfluss der HYP-DCHA-Beladung auf die Wiederfindung des HYP-DCHA. Bei höheren HYP-DCHA-Beladungen steigt in der Regel auch die Wiederfindung von HYP-DCHA. Fraglich ist, ob dieser Effekt mit einem systematischen Fehler bei kleineren Peakflächen in der instrumentellen Analytik zusammenhängt oder ein Zufallsprodukt aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen ($n = 1$) ist. Denkbar wäre auch ein Einschluss des HYP-DCHA in die ANP, was bei einer begrenzten Einschlusskapazität in Korrelation mit einer geringeren HYP-DCHA-Wiederfindung bei niedrigen Beladungskonzentrationen stehen könnte.

Im Vergleich zu den ca. 90 nm großen ANP (siehe Kapitel 4.2.1.2 und folgende) hat die Vorsäule der HPLC mit 12 nm eine geringere Porengröße, weshalb die ANP aus der Formulierung von der Vorsäule abfiltriert werden. In Abhängigkeit von der Bindungsaffinität zwischen dem BSA der ANP und dem HYP-DCHA wird deshalb ein Teil des HYP-DCHA mit den ANP zurückgehalten und nicht quantifiziert. Dies könnte erklären, weshalb die HYP-DCHA-Wiederfindung linear mit der Beladungskonzentration ansteigt. Außerdem könnte sich die Bindungsaffinität der ANP durch die unterschiedlichen äußeren Phasen ändern, was die unterschiedlichen Steigungen erklären könnte, die allerdings alle in der gleichen Größenordnung liegen.

Die Theorie des Einschlusses von HYP-DCHA wurde von Füller und Kellner et al. publiziert [39]. Es ist denkbar, dass diese Einlagerung nach der Desolvatation oder Quervernetzung der ANP nicht mehr möglich ist, da sich eine geschlossene ANP-Oberfläche ausbildet. Dementsprechend ist die Wiederfindung bei den DMEM-haltigen Formulierungen, die erst nach der Quervernetzung [HnQ] beladen wurden, im Mittel höher als bei den ANP-Formulierungen mit den äußeren Phasen Ethanol und



(a) Inkorporation von HYP-DCHA bzw. das Eindringen bei einer porösen Oberfläche.



(b) Beladung nach der Desolvatation/Quervernetzung nur auf der Oberfläche möglich.

Abbildung 4.7: Modellhafte Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten von HYP-DCHA (helle Flächen) beladener ANP.

Trehalose, welche vor dem Desolvatationsreagenz Ethanol [HvE] beladen wurden. Die Abbildung 4.7 visualisiert diesen Gedankengang. HYP-DCHA, welches hauptsächlich mit der ANP-Oberfläche wechselwirkt, kann mit dem HPLC-Fließmittel leichter in ein Verteilungsgleichgewicht treten. Bei eingeschlossenem HYP-DCHA ist dieser Vorgang beeinträchtigt, weshalb das HYP-DCHA nicht detektiert wird, sondern mit den ANP von der Vorsäule abfiltriert wird.

$$\begin{aligned} c_{\text{HYP-DCHA}_{\text{eingeschlossen}}} &= (1 - W_{\text{HYP-DCHA}}) \cdot c_{\text{HYP-DCHA}_{\text{Beladung}}} \\ &= (1 - 0,7696) \cdot 2,0 \mu\text{mol/l} = 0,46 \mu\text{mol/l}. \end{aligned} \quad (4.2.1)$$

Der eingeschlossene und damit abfiltrierte Anteil von HYP-DCHA ist in Tabelle 4.10 in den normalisierten Konzentrationen nach Gleichung 4.2.1 dargestellt. Die Berechnung für diese Daten ergibt sich aus dem nicht wiedergefundenen HYP-DCHA-Anteil (inverse HYP-DCHA-Wiederfindung), multipliziert mit der eingesetzten HYP-DCHA-

Beladung in $\mu\text{mol/l}$	HYP-DCHA-Einschluss, normalisiert in $\mu\text{mol/l}$		
	ÄP Ethanol	ÄP Trehalose	ÄP DMEM
0,3	0,21	0,18	0,02
1	0,37	0,45	0,37
2	0,46	0,53	0,30
5	0,88	1,16	0,40
10	0,68	1,57	0,32

Tabelle 4.10: HYP-DCHA-Konzentration, die nicht detektiert wurde. Die ANP-Formulierungen mit Ethanol und Trehalose als äußere Phasen wurden vor dem Desolvatationsreagenz Ethanol [HvE] beladen, während die ANP-Formulierungen mit DMEM als äußere Phase nach der Quervernetzung [HnQ] beladen wurden, Berechnung nach Gleichung 4.2.1 ($n = 1$, ÄP: Äußere Phase).

Konzentration (normalisiert), um die Einschlusskonzentrationen miteinander zu vergleichen. Als Beispielrechnung sei die HYP-DCHA-Wiederfindung der ethanolhaltigen ANP-Formulierung mit $2,0 \mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA aus Tabelle 4.9 aufgeführt.

Die Darstellung in Tabelle 4.10 zeigt, dass der Anteil von HYP-DCHA, der mit den ANP abfiltriert wird, mit zunehmender HYP-DCHA-Konzentration ansteigt. Dies lässt sich damit erklären, dass der Anteil an HYP-DCHA, der bei der Desolvatation in den ANP eingeschlossen wird, abhängig von der HYP-DCHA-Konzentration in der Gesamtformulierung ist. Bei höheren HYP-DCHA-Konzentrationen kann durch ein Konzentrationsgleichgewicht mehr HYP-DCHA in den ANP inkorporiert werden.

Diese Theorie wird durch den Vergleich mit der DMEM-haltigen Formulierung gestützt. Hier konnte das HYP-DCHA herstellungsbedingt [HnQ] nur mit der ANP-Oberfläche wechselwirken und nicht in diese inkorporieren. Dementsprechend haben die Konzentrationen in der Tabelle 4.10 bei den DMEM-haltigen Formulierungen alle die gleiche Größenordnung und entsprechen dem Verteilungsgleichgewicht zwischen ANP- und Fließmittel-Wechselwirkungen.

Da ein Einfluss der Beladungszeitpunkte auf die HYP-DCHA-Wiederfindung im letzten Kapitel 4.2.2.1 ausgeschlossen wurde, zumindest bei HYP-DCHA-Beladungs-

konzentrationen von ca. 6 $\mu\text{mol/l}$, scheint DMEM als äußere Phase unabhängig von der Beladungskonzentration einen positiven Einfluss auf das HYP-DCHA zu haben. Da DMEM ein komplexes Medium aus unterschiedlichen Salzen und Additiven ist, scheint dieses HYP-DCHA in geringem Umfang zu stabilisieren.

Auch wenn in den Ergebnissen Trends erkennbar sind, müssen diese kritisch betrachtet werden, da die geringen HYP-DCHA-Konzentrationsbeladungen von 0,3 $\mu\text{mol/l}$ mit der verwendeten Methode nur schwer quantifizierbar sind. Wird das in Kapitel 3.2.4.7 beschriebene Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) berechnet, so ergibt sich beispielsweise bei der ethanolhaltigen ANP-Formulierung ein Verhältnis von 6. Damit liegt dieser Wert zwar oberhalb der Nachweisgrenze ($S/N > 3$), aber unterhalb der Bestimmungsgrenze, die nach der ICH Q2(R1) Guideline [118] erst ab einem Verhältnis von $S/N > 10$ erreicht ist. Je kleiner die Konzentration eines Analyten ist und je näher er damit bei der Nachweisgrenze liegt, umso mehr streuen die gemessenen Werte. Weitere Experimente, die diese Aspekte und Fehlerquellen mit einer höheren Wiederholungsanzahl betrachten, sind deshalb zusätzlich im nächsten Kapitel beschrieben.

4.2.2.3 ANP-Konzentration

Untersucht wird folgend die ANP-Kapazität zur Stabilisierung des HYP-DCHA mit der äußeren Phase DMEM. Da die Konzentration an ANP in der Formulierung nur rechnerisch ermittelt werden kann, wird im Folgenden wieder die BSA-Konzentration der Formulierung angegeben, die sich indirekt auf die ANP-Konzentration bezieht. Die BSA-Konzentration der ANP-Formulierungen, die bisher immer konstant bei 0,8 mg/ml lag, wurde zwischen 0,2 und 3,2 mg/ml BSA variiert. Dadurch kann sowohl der Einfluss von höheren als auch von niedrigeren ANP- bzw. BSA-Konzentrationen beurteilt werden. Als Erweiterung zum vorherigen Kapitel 4.2.2.2 wurden für die HYP-DCHA-Beladungskonzentrationen von 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ die Versuche bei einer ANP- bzw. BSA-Konzentration von 0,8 mg/ml wiederholt und um die doppelte ANP- bzw. BSA-Konzentration von 1,6 mg/ml erweitert. Aufgrund der Übersichtlichkeit und veränderten Fragestellung sind die Ergebnisse alle in Tabelle 4.11 zusammengefasst.

Wie der Tabelle 4.11 zu entnehmen ist, stieg der wiedergefundene HYP-DCHA-Anteil bei 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA mit zunehmender ANP- bzw. BSA-Konzentration von 46,04 % um 16,23 %-Punkte auf 62,27 % an. Die höheren HYP-DCHA-Beladungen mit 5 und 10 $\mu\text{mol/l}$ zeigten innerhalb der getesteten ANP- bzw. BSA-Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die HYP-DCHA-Wiederfindungen und bestätigen damit die Daten aus dem vorherigen Kapitel 4.2.2.2. In diesem wurde festgestellt, dass es bei einer Beladung nach der Quervernetzung [HnQ] keinen bzw. einen nur sehr geringen Einfluss der Beladungskonzentration auf die HYP-DCHA-Wiederfindung gibt, da dass HYP-DCHA bei dieser Beladungsmethode nur schwer in die ANP inkorporieren kann (vergleiche Abbildung 4.7).

Beladung in $\mu\text{mol/l}$	BSA-Konz. in mg/ml	HYP-DCHA-Wiederfindung \pm SD in % Äußere Phase DMEM
1	0,2	46,04 \pm 1,44
1	0,8	53,06 \pm 8,30
1	1,4	56,08 \pm 7,43
1	2	57,19 \pm 6,03
1	2,6	59,04 \pm 4,75
1	3,2	62,27 \pm 4,80
5	0,8	86,48 \pm 7,85
5	1,6	82,09 \pm N/A
10	0,8	91,26 \pm 7,82
10	1,6	96,79 \pm N/A

Tabelle 4.11: Einfluss der ANP- bzw. BSA-Konzentration auf die HYP-DCHA-Wiederfindung für den Beladungszeitpunkt nach der Quervernetzung [HnQ] und mit DMEM als äußeren Phase ($n = 3$, die Werte mit N/A als Standardabweichung $n = 1$, N/A: nicht vorhanden).

Diskussion

Die HYP-DCHA-Wiederfindung steigt bei 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA in etwa linear mit der ANP- bzw. BSA-Konzentration an:

$$f(x) = 4,77x + 47,50 \quad (4.2.2)$$

Die ANP- bzw. BSA-Konzentration in der Gleichung 4.2.2 entspricht dem Term x . Das Bestimmtheitsmaß liegt bei $R^2 = 0,914$. Die Gleichung 4.2.2 unterstreicht noch einmal den positiven Einfluss von BSA auf die HYP-DCHA-Stabilität. Ohne BSA liegt die HYP-DCHA-Wiederfindung nach Gleichung 4.2.2 bei ca. 50 % und erreicht bei einer theoretischen ANP- bzw. BSA-Konzentration von 10 mg/ml eine HYP-DCHA-Wiederfindung von über 95 %. Dieser extrapolierte Wert ist allerdings nur unter Annahme einer vollständig linearen Abhängigkeit korrekt und wird spätestens durch die Viskosität einer entsprechend hohen BSA-Konzentration limitiert.

Beladung in $\mu\text{mol/l}$	BSA-Konz. in mg/ml	HYP-DCHA-Einlagerung in $\mu\text{mol/l}$ Äußere Phase DMEM
1	0,2	$0,54 \pm 0,00$
1	0,8	$0,47 \pm 0,07$
1	1,4	$0,44 \pm 0,10$
1	2	$0,43 \pm 0,12$
1	2,6	$0,41 \pm 0,12$
1	3,2	$0,38 \pm 0,15$
5	0,8	$0,68 \pm 0,06$
5	1,6	$0,90 \pm \text{N/A}$
10	0,8	$0,87 \pm 0,06$
10	1,6	$0,32 \pm \text{N/A}$

Tabelle 4.12: Einfluss der ANP- bzw. BSA-Konzentration und der HYP-DCHA-Konzentration auf den potentiell inkorporierten HYP-DCHA-Anteil für den Beladungszeitpunkt nach der Quervernetzung [HnQ] und mit DMEM als äußere Phase, Berechnung nach Gleichung 4.2.1 ($n = 3$, die Werte mit N/A als Standardabweichung $n = 1$, N/A: nicht vorhanden).

Wie im vorherigen Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, wurden nach Gleichung 4.2.1 die inkorporierten HYP-DCHA-Anteile berechnet (Tabelle 4.12). Interessant ist die Tatsache,

dass die Erhöhung der ANP- bzw. BSA-Konzentration zu keinem Anstieg von inkorporiertem oder gebundenem HYP-DCHA führt. Es könnte die Annahme getroffen werden, dass mit einer höheren ANP-Konzentration auch mehr HYP-DCHA mit den ANP in Wechselwirkung tritt. Dass sich dies nicht in der Tabelle 4.12 widerspiegelt, lässt sich dadurch erklären, dass das HYP-DCHA erst nach der Quervernetzung [HnQ] hinzugegeben wurde und dadurch, wie in Abbildung 4.7 beschrieben, nur mit der Oberfläche der ANP wechselwirken kann. Bei der HPLC-Analytik wird dieses HYP-DCHA fasst vollständig durch das organische Fließmittel von der ANP-Oberfläche abgelöst, wodurch nahezu alles an HYP-DCHA in den Formulierungen detektiert werden kann. Die in der Tabelle 4.12 beschriebenen Konzentrationen an inkorporiertem HYP-DCHA bei einer HYP-DCHA-Beladung von $1\text{ }\mu\text{mol/l}$ mit $\bar{x} = 0,45\text{ }\mu\text{mol/l}$ entsprechen deshalb eher dem durch Degradierung zerstörten Anteil. Eine alternative Erklärung zum degradierten HYP-DCHA wäre, dass es sich bei den ANP nach der Quervernetzung nicht um vollständig geschlossene Partikel handelt, sondern um poröse Strukturen. In diese porösen Strukturen kann sich abhängig von der HYP-DCHA-Beladung ein Teil des HYP-DCHA einlagern. Diese Erklärung würde die in Tabelle 4.12 erhöhten HYP-DCHA Einlagerungen bei höheren HYP-DCHA-Beladungen erklären und sich mit den Ergebnissen aus den vorangegangenen Kapiteln decken.

4.2.2.4 Lagerstabilität

Für die Lagerstabilität wurden stichprobenartig einzelne ANP-Formulierungen untersucht. Nach 5 Tagen waren beispielsweise in einer ethanolhaltigen ANP-Formulierung mit einer Beladung von $5\text{ }\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA und einem Beladungszeitpunkt vor dem Desolvatationsreagenz Ethanol [HvE] noch $95,3 \pm 1,4\%$ der ursprünglichen HYP-DCHA-Beladung detektierbar.

Weitere Einzelversuche sind der Tabelle 4.13 zu entnehmen. Die HYP-DCHA-Wiederfindung sinkt innerhalb von 15 Tagen bei einer HYP-DCHA-Beladungskonzentration von $1\text{ }\mu\text{mol/l}$ um 5 %-Punkte und bei einer HYP-DCHA-Beladungskonzentration von $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ um 22 %-Punkte.

Beladung in $\mu\text{mol/l}$	HYP-DCHA-Wiederfindung in %	
	Tag 0	Tag 15
1	62,91	57,90
2	85,20	84,18
5	92,03	84,15
10	96,79	75,00

Tabelle 4.13: Einfluss der HYP-DCHA-Beladungskonzentration auf die Lagerstabilität des HYP-DCHA mit einer äußeren Phase aus DMEM und einem Beladungszeitpunkt nach der Quervernetzung [HnQ] (BSA-Konzentration 0,8 mg/ml, n = 1).

Diskussion

Da die HYP-DCHA-Wiederfindung nach 15 Tagen bei der ANP-Formulierung mit 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA um fast 22 % abnahm und damit die im Verhältnis zu den geringer beladenen Formulierungen niedrigste HYP-DCHA-Wiederfindung aufwies, bestätigt sich erneut die stabilisierende Wirkung von BSA auf das HYP-DCHA. Ab einer HYP-DCHA-Beladungskonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ reicht die BSA-Konzentration von 0,8 mg/ml anscheinend nicht mehr aus, um das HYP-DCHA in der ANP-Formulierung über einen längeren Zeitraum zu stabilisieren. Der Zusammenhang zwischen der HYP-DCHA-Stabilität und der BSA-Konzentration zeigte sich auch in den vorangegangenen Kapiteln und wurde dort ausführlich erörtert.

Da alle Daten darauf hindeuten, dass die Beladung der ANP stark limitiert ist und die Zellkulturexperimente verdeutlichten, dass auch freies BSA aus dem FCS-Zusatz eine ähnliche stabilisierende Wirkung auf das HYP-DCHA hat (siehe Kapitel 4.4), wurde im nächsten Kapitel eine gänzlich neue Formulierung auf Lipidbasis untersucht. Dabei sind die hier gewonnenen Erkenntnisse der stabilisierenden Wirkung von BSA in die Entwicklung der lipidbasierten Arzneistoffträgersysteme eingeflossen.

4.3 Lipidbasierte Nanopartikel

Nachdem im vorherigen Kapitel 4.2 (ab S. 90) hydrophile Albumin-Nanopartikel untersucht wurden, werden in diesem Kapitel lipidbasierte Arzneistoffträgersysteme beschrieben. Als Formulierungen kommen Suspensionen fester Lipidnanopartikel (solid lipid nanoparticles, SLN) und Nanoemulsionen (NE) zum Einsatz. Da sich diese Formulierungen in vielen Bereichen ähneln, werden sie meistens vergleichend untersucht. An Stellen, an denen sie sich unterscheiden, werden sie in getrennten Kapiteln behandelt.

4.3.1 Herstellungsoptimierung

Mit einer statistischen Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) wurden die Prozessparameter für die Herstellung der lipidbasierten Nanopartikel in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage optimiert. Aus früheren Arbeiten sind bereits Prozessparameter bekannt, mit denen ein bestimmter Partikelgrößenbereich in der Endformulierung erreicht werden kann [106, 131]. Diese Parameter wurden durch *Versuch und Irrtum* ermittelt. Ziel des DoE ist es, ein tieferes Prozessverständnis der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage zu erlangen und die einzelnen Einflussparameter in Bezug auf die Partikelgröße zu optimieren.

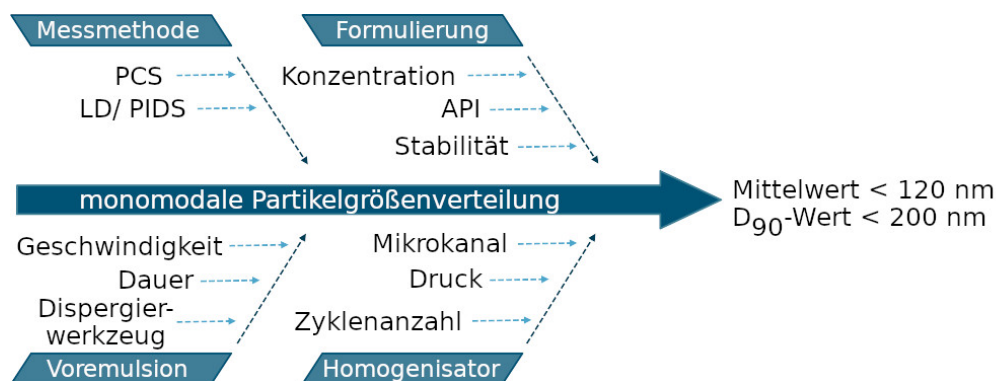


Abbildung 4.8: Ishikawa-Diagramm zur grafischen Darstellung der Einflussfaktoren auf die Partikelgröße.

Mit einem Ishikawa-Diagramm wurden elf Faktoren (siehe Abbildung 4.8) identi-

fiziert, die einen Einfluss auf die Partikelgröße haben. Von diesen Faktoren sind der Homogenisierdruck, die Anzahl der Zyklen und die Zeitspanne der Voremulgierung direkt bei der Herstellung beeinflussbar und deshalb für das tiefere Prozessverständnis der Anlage besonders wichtig.

VNr.	Druck in bar	Zyklen	VED in s	Mittelwert in nm	Spanne in nm
1	1377	4	98	113,15	1,02
2	1050	3	120	111,81	1,01
3	1050	1	65	1648,01	38,87
4	723	4	32	109,68	0,98
5	1377	4	32	137,80	0,75
6	1050	3	65	114,16	1,03
7	723	2	32	7529,33	101,28
8	1050	3	65	119,33	1,09
9	1050	5	65	138,97	0,64
10	1050	3	65	113,83	1,03
11	1377	2	32	2224,20	39,53
12	723	2	98	8817,38	99,67
13	500	3	65	13 431,20	6,87
14	1377	2	98	3592,62	87,12
15	1050	3	65	109,92	0,99
16	723	4	98	110,36	0,99
17	1050	3	10	113,40	1,02
18	1600	3	65	2713,14	17,83
19	1050	3	65	111,97	1,01
20	1050	3	65	112,10	1,01

Tabelle 4.14: Versuchsplan des DoE mit der resultierenden, gemessenen Partikelgröße.

VNr.: Versuchsnummer, Druck: Homogenisierdruck, Zyklen:

Zyklusanzahl, VED: Voremulgierdauer, Mittelwert: arithmetischer

Mittelwert der Partikelgröße, Spanne: normalisierte Spannbreite der

Partikelgrößenverteilungen nach Gleichung 3.2.15.

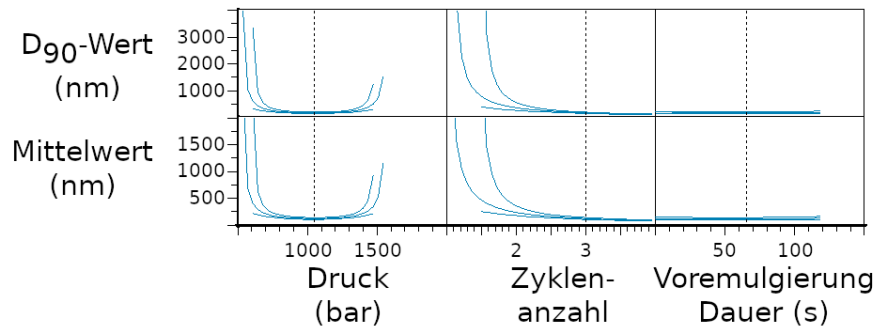
Die festgelegten Randbedingungen für diese im DoE betrachteten Einflussfaktoren sind beim Homogenisierdruck 500 bis 1600 bar, die Zyklusanzahl 1 bis 5 und die Zeitspanne der Voremulgierung von 10 bis 120 Sekunden. Die Randbedingungen wurden auf Grundlage von Anlagenspezifikationen und Vorversuchen festgelegt.

So ist die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage für maximal 1600 bar ausgelegt und aus Vorversuchen ist bekannt, dass unter 500 bar Partikel $\geq 1 \mu\text{m}$ entstehen. Mit der Voremulgierdauer wurden die drei Einflussfaktoren der Voremulsion auf eine einfach zu ändernde Ausprägung begrenzt und die anderen beiden Faktoren Geschwindigkeit des Dispergiergeräts und Art des Dispergierwerkzeugs konstant gehalten. Alternativ hätte beispielsweise auch die Geschwindigkeit des Dispergiergeräts angepasst werden können.

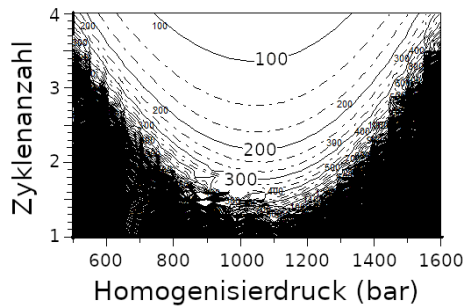
Für das DoE wurde ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan (Central Composite Design, CCD) verwendet, welcher aus einem 2^k faktoriellen Design und einem $2k$ Sternpunktversuch zusammengesetzt ist. Dabei entspricht k der Anzahl der untersuchten Faktoren, in diesem Fall drei. Die Begründung für die Wahl dieses Designs und der theoretische Hintergrund hierzu sind in Kapitel 3.2.2 nachzulesen.

Pro Parameter wurden jeweils fünf Variationen untersucht, die alle innerhalb oder genau an den Grenzen des Wertebereichs lagen, womit das CCD im Speziellen der Form eines Central Composite Inscribed (CCI) Modells entsprach. Als DoE-Ausgabegrößen wurden der arithmetische Mittelwert mit kleiner 120 nm und der D_{90} -Wert kleiner 200 nm definiert. Der Versuch bestand aus 20 Einzelproben, die mit variierenden Prozessparametern in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage verarbeitet wurden. Die Reihenfolge der Einzelversuche erfolgte zufällig. Die Prozessparameter und die daraus resultierenden Partikelgrößenverteilungen sind in Tabelle 4.14 aufgelistet. Aus diesen Ergebnissen wurden mit der Software Cornerstone Vorhersagediagramme (Abbildung 4.9) für die einzelnen Prozessparameter und die Gleichung 4.3.1 berechnet (siehe auch Kapitel 3.2.2).

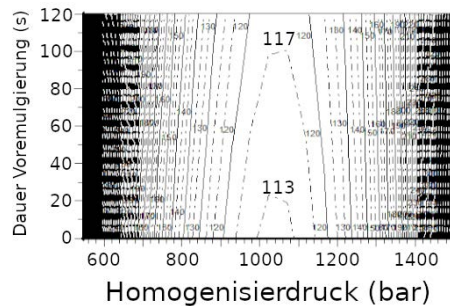
Die Ergebnisse in Abbildung 4.9 zeigten einen schwachen Einfluss der Voremulgierdauer und einen starken Einfluss des Homogenisierdrucks sowie der Zyklenanzahl. Der Abbildungsteil 4.9 (a) beschreibt die prognostizierten Funktionen für die Partikelgröße des D_{90} -Werts (oben) und des arithmetischen Mittelwerts (unten). Die Partikelgröße ist jeweils gegen die drei untersuchten Prozessparameter aufgetragen. Jedem der Parameter sind drei Graphen zugeordnet, wobei der mittlere Graph den Mittelwert und die äußeren Graphen die maximale Abweichung zum prognostizierten Mittelwert nach oben und unten angeben.



(a) Prognostizierte Funktionen für die Größe vom arithmetischen Mittelwert und D_{90} -Wert.



(b) Prognostizierte arithmetische Partikelgröße mit Zyklusanzahl über Druck.



(c) Prognostizierte arithmetische Partikelgröße mit Voremulgierungdauer über Druck.

Abbildung 4.9: Prognostizierte Partikelgrößen aus der statistischen Versuchsplanung.

Dem Homogenisierdruck liegt eine quadratische Funktion zugrunde, da nur ein Polynom 2. Grades die Partikelgröße druckabhängig mit einem Minimum beschreiben kann. Diese quadratische Abhängigkeit wird noch einmal in Abbildungsteil 4.9 (b) deutlich. Bei niedrigen und auch bei hohen Drücken steigt die Partikelgröße an. Bei einem mittleren Druck von 1050 bar wird ein Minimum der Partikelgröße erreicht. Durch Erhöhung der Zyklusanzahl sinkt die Partikelgröße und konvergiert in Abhängigkeit vom Druck gegen einen Grenzwert von 118 nm (in Abbildungsteil 4.9 (a) durch gestrichelte Linien markiert).

Bei der Zyklusanzahl macht eine Prognose unter 3 Zyklen keinen Sinn, da die Schwankungsbreiten (Differenz zwischen maximaler und minimaler prognostizier-

ter Partikelgröße) sehr groß werden und auch die vorhergesagte Partikelgröße bei 2 Zyklen und einem Druck von 1050 bar schon bei 235 nm liegt. Durch den geringen Einfluss der Voremulgiezeit sind auch die Schwankungsbreiten in Abbildung 4.9 (a) vernachlässigbar gering. Die fast vertikalen Linien im prognostizierten Konturdiagramm von Abbildungsteil 4.9 (c) verdeutlichen noch einmal den geringen Einfluss der Voremulgiezeit. Die Partikelgröße ist hier nur vom Homogenisierdruck abhängig.

Mit der Software Cornerstone wurden die einzelnen Termsignifikanzen ausgewertet. Dadurch konnte sowohl eine Wechselwirkung zwischen dem Homogenisierdruck und der Zyklenanzahl, als auch die quadratische Abhängigkeit der Partikelgröße vom Homogenisierdruck festgestellt werden. Die Ausgabegrößen sind reziprok, da ein steigender Druck umgekehrt proportional zur Partikelgröße ist. Das Bestimmtheitsmaß für den arithmetischen Mittelwert liegt bei 0,957, das für den D_{90} -Wert bei 0,960. Basierend auf den Erkenntnissen der statistischen Versuchsplanung lässt sich aus einem vordefinierten Druck und der Zyklenanzahl die resultierende Partikelgröße n berechnen (Gleichung 4.3.1, Koeffizienten in Tabelle 4.15). Aufgrund der vordefinierten Parametergrenzwerte im DoE und der großen Schwankungsbreite bei bestimmten Drücken oder Zyklen muss der Definitionsbereich D_f der Gleichung 4.3.1 auf einen Druck von 700 bis 1400 bar und eine Zyklenanzahl von ≥ 3 eingeschränkt werden.

$$n = f(h, z) = \left(m + h \cdot p + z \cdot c + h^2 \cdot q \right)^{-1} \quad (4.3.1)$$

n : Partikelgröße in nm

h : Homogenisierdruck in bar

z : Zyklenanzahl

$$D_f = \{h, z \in \mathbb{R} \mid 700 \leq h \leq 1400 \mid z \geq 3\}$$

Durch eine quadratische Ergänzung lässt sich die Gleichung 4.3.1 so umstellen, dass mit einer vordefinierten Partikelgröße n die möglichen Homogenisierdrücke h berechnet werden können (Gleichung 4.3.2). Da die Partikelgröße quadratisch von dem Homogenisierdruck abhängt, resultieren immer zwei mögliche Homogenisierdrücke

Koeffizient	arithmetischer Mittelwert	D_{90} -Wert
m	$-3,86 \times 10^{-2}$	$-2,55 \times 10^{-2}$
p	$6,56 \times 10^{-5}$	$4,26 \times 10^{-5}$
c	$4,24 \times 10^{-3}$	$2,89 \times 10^{-3}$
q	$-3,13 \times 10^{-8}$	$-2,03 \times 10^{-8}$

Tabelle 4.15: Koeffizienten zur Gleichung 4.3.1 für die Vorhersage der Partikelgröße.

aus der Gleichung. Beispieldrucke für bestimmte Partikelgrößen sind zusammen mit ihren vorausgesagten Schwankungsbreiten in Tabelle 4.16 aufgelistet.

$$h = f(n, z) = \frac{\left(\frac{p}{q}\right)}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{\left(\frac{p}{q}\right)}{2}\right)^2 - \frac{m + z \cdot c - \frac{1}{n}}{q}} \quad (4.3.2)$$

h : Homogenisierdruck in bar

n : Partikelgröße in nm

z : Zyklenanzahl

$$D_f = \{n, z \in \mathbb{R} \mid 118 \leq n \leq 217 \mid z \geq 3\}$$

Partikel- größe in nm	Homogenisierdruck in bar		Schwankungsbreite in nm	
	unterer Druck	oberer Druck	unterer Druck	oberer Druck
118	1037,3	1058,7	31,3	31,3
120	980,0	1116,0	32,2	31,8
130	889,5	1206,5	37,6	36,3
140	841,4	1254,6	43,8	42,0
150	807,4	1288,6	51,8	49,4
160	781,1	1314,9	61,5	58,1

Tabelle 4.16: Beispiele für berechnete Homogenisierdrücke (Gleichung 4.3.2) mit resultierender Schwankungsbreite (mit Cornerstone berechnet) der Partikelgrößenvorhersage bei einer konstanten Zyklenanzahl von 3.

Wenn die Partikelgröße um maximal 20 nm von der prognostizierten Partikelgröße abweichen darf, dann muss ein Druck zwischen 830 und 1280 bar verwendet werden. Ober- und unterhalb dieser Homogenisierdrücke nimmt die Abweichung vom prognostizierten Mittelwert exponentiell zu. Bei einem Druck von beispielsweise 980,0 bar ergibt sich, wie aus der Tabelle 4.16 hervorgeht, eine Schwankungsbreite von 32,2 nm. Dies kann zu Partikelgrößen führen, die bis zu 16,1 nm von den erwarteten 120 nm großen Partikeln abweichen. Bei 700 oder 1400 bar können die prognostizierten Werte schon über 50 nm abweichen (nicht mehr in der Tabelle 4.16 dargestellt). Außerdem wird aus Tabelle 4.16 deutlich, dass die Funktion nicht symmetrisch ist und die Schwankungsbreite bei höheren Drücken in der Regel etwas geringer ausfällt.

Diskussion

Die Ergebnisse der statistischen Versuchsplanung liefern mit Gleichung 4.3.2 ein gutes Vorhersagemodell für definierte Partikelgrößen. Eine zusätzliche Erkenntnis ist, dass bei drei Zyklen innerhalb eines Druckbereichs von 980 bis 1116 bar Partikelgrößen von 120 nm entstehen. Damit ist die Methode gegenüber Druckschwankungen von 136 bar sehr robust. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich der Voremulgierprozess unkritisch auf die Partikelgröße auswirkt.

Der beobachtete quadratische Einfluss des Druckes (vergleiche Abbildungsteil 4.9 (b)) ist auch in Lehrbüchern beschrieben (siehe Voigt, Pharmazeutische Technologie [132, S. 441]). Das Konturdiagramm 4.9 (b) zeigt bei hohen und bei niedrigen Drücken sowie bei einer niedrigen Zyklenanzahl keine klar definierten Konturen. Dies resultiert aus den hohen Schwankungsbreiten, die aus der schlechten Reproduzierbarkeit der Partikelgrößen für diese Parameter hervorgehen (vergleiche auch Tabelle 4.16). Die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage besitzt dementsprechend einen optimalen Prozessbereich bei 3 Zyklen und einem Druck zwischen 856 und 1240 bar (Schwankungsbreite der Vorhersagewerte unter 40 nm, mit Cornerstone berechnet).

Durch das Totvolumen der Anlage von 1 bis 2 Millilitern erhält man nach dem ersten Zyklus eine Mischung aus Probe und Reinigungsflüssigkeit. Bei 15 ml pro Probe entspricht das im Mittelwert 9,3 % Reinigungsflüssigkeit (Versuche mit $n = 3$). Bei zwei Zyklen entsteht eine Mischung aus einem Teil Probe, der zweimal durch den Mikroka-

nal gepresst wurde, und einem Teil, welcher erst einmal den Mikrokanal passiert hat. Ab einer Zyklenanzahl von drei wurde die gesamte Probe mindestens zweimal durch den Mikrokanal gepresst, womit eine Spannweite der Partikelgrößenverteilung von nahe 1 erreicht wird. Dies wird durch reproduzierbare Partikelgrößen im beschriebenen Konturdiagramm Abbildung 4.9 Teil (b) mit klar definierten Konturen oberhalb eines Druckbereichs von 700 bis 1400 bar sichtbar.

Die Voremulgierung (IKA Ultra-Turrax, 12,000 rpm, Dispergierwerkzeug S 25 N - 10 G) erzeugt nach 10 s Tröpfchen mit einem mittleren Durchmesser von 16 μm . Die mechanischen Zerteilungsvorgänge der inneren Phase sind in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage allerdings aufgrund der höheren Energieeintragung viel größer als die des Hand-Dispergiergeräts bei der Voremulgierung. Aus diesem Grund ist die Dauer der Voremulgierung und damit der Zerteilungsgrad der inneren Phase unerheblich (Abbildung 4.9 Teil (c)).

Die postulierten Partikelgrößen im Abbildungsteil 4.9 (c) beginnen bei einer Voremulgierdauer von 0 Sekunden. Diese Werte sind extrapoliert und hängen stark von der Zyklenanzahl ab, da die Durchmischung der einzelnen Phasen ohne Voremulgierung erst nach dem ersten Zyklus durch die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage erfolgt. Sobald die Zyklenanzahl ≥ 3 war, hatte die fehlende Voremulgierung keinen Einfluss mehr auf die Partikelgröße. Des Weiteren bleibt während des Einsaugens der Probe in die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage immer ein kleiner Rest (1 - 2 ml) im Probengefäß zurück, weshalb die Zusammensetzung der Formulierung ohne Voremulgierung nicht genau definiert werden kann.

Die Reinigung der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage zwischen jeder Probe mit Wasser und Isopropanol (erst zweimal Wasser, dann einmal Isopropanol und dann wieder zweimal Wasser) ist sehr wichtig. Aufgrund des Totvolumens in der Anlage kommt es ansonsten zu Vermischungen der unter verschiedenen Parametern hergestellten Proben. Diese Vermischungen der einzelnen Proben führen zu nicht auswertbaren DoEs mit sehr hohen Standardabweichungen, welche sich auch nicht durch eine Erhöhung der Probenanzahl auf über 30 Einzelproben erniedrigen ließen.

Durch das DoE war es möglich die Parameter für definierte Partikelgrößen in einem Bereich von 118 bis 150 nm vorherzusagen. Kleinere Partikelgrößen konnten mit der

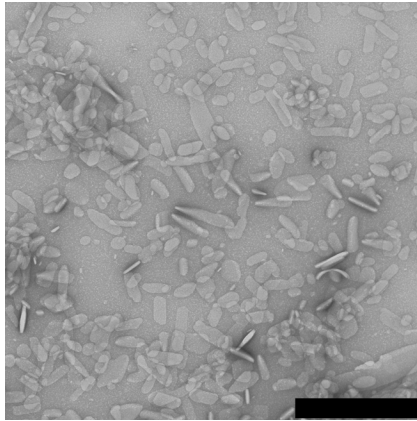
Anlage nicht erzeugt werden. Oberhalb von 150 nm war die Schwankungsbreite mit 50 nm zu groß, um eine adäquate Vorhersage der Partikelgröße zu treffen.

Durch den Verschleiß der Mikrokanäle vergrößert sich deren Querschnitt (siehe Kapitel 4.3.3.3). Dadurch nehmen die Scherkräfte ab, was zu größeren Partikeln in der Formulierung führt. Dies verschiebt die Funktion in Abbildungsteil 4.9 (b) nach rechts zu höheren Drücken. Dementsprechend muss der Homogenisierdruck erhöht werden, um weiterhin eine definierte Partikelgröße zu erhalten. Damit alle nachfolgenden Versuche bei konstanten Prozessparametern hergestellt werden konnten, wurde mit Hilfe der Gleichung 4.3.1 ein Druck ermittelt, bei dem die Schwankungsbreite des vorhergesagten arithmetischen Mittelwerts unter 40 nm lag. Dadurch konnte ein Homogenisierdruck von 1240 bar mit 3 Zyklen und einer Voremulgierdauer von 10 s festgelegt werden. Der vorhergesagte arithmetische Mittelwert lag bei 139 nm mit einem Schwankungsbereich von 121 bis 163 nm. Da für das DoE ein neuer Mikrokanal verwendet wurde, lagen die Partikelgrößen für die hergestellten Formulierungen stets unterhalb des vorhergesagten Wertes von 139 nm und nahe am unteren Vorhersagebereich von 121 nm (vergleiche Abbildung 4.11 im nachfolgenden Kapitel). Obwohl das DoE für feste Lipidnanopartikeldispersionen erstellt wurde, konnten die gefundenen Parameter auch für die Herstellung von Nanoemulsionen verwendet werden.

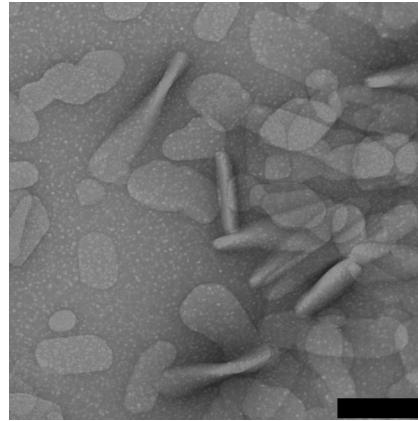
4.3.2 Physikochemische Charakterisierung

Die Aufnahmen des Transmissionselektronenmikroskops (TEM) in Abbildung 4.10 ermöglichen eine Vorstellung der Morphologie der SLN- und NE-Formulierungen. Zur Herstellung der elektronenmikroskopischen Präparate aus den Formulierungen wurde, wie in Kapitel 3.2.4.4.4 beschrieben, die Negativkontrastierung mit Uranylacetat und die Gefrierbruchtechnik verwendet. Die unbeladenen, festen Lipidnanopartikel in den Abbildungsteilen 4.10 (a) und (b) haben eine plättchenartige, längliche Struktur. In der Vergrößerung in Abbildungsteil 4.10 (b) sind Partikel zu erkennen, die teilweise auf der Seite liegen und in sich verdreht sind. Dünne, nadelförmige Erscheinungen sind Plättchen in der Seitenansicht. Die Nanoemulsionen (NE) in Abbildung 4.10 Teil (c) zeigen klassische, rundliche Formen. In Abbildungsteil 4.10 (d) ist ein ande-

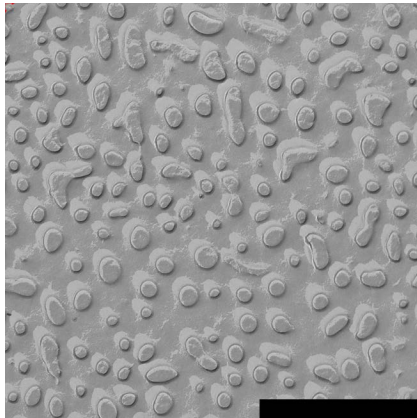
rer Ausschnitt der NE-Proben zu sehen. Im Vergleich zum Teil (c) sind in diesem Ausschnitt auch Vertiefungen zu erkennen.



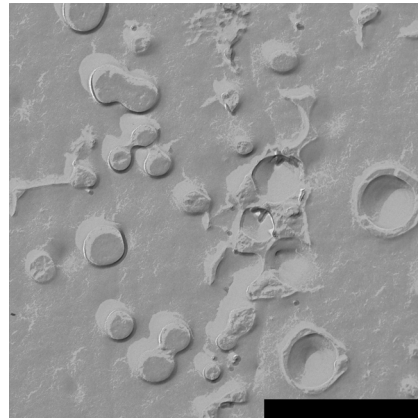
(a) Maßstabsbalken 1 μm .



(b) Maßstabsbalken 200 nm.



(c) Maßstabsbalken 1 μm .



(d) Maßstabsbalken 1 μm .

Abbildung 4.10: Transmissionselektronenmikroskopie, Präparatherstellung für die SLN-Formulierung durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat und für die NE-Formulierungen durch die Gefrierbruchtechnik, (a) und (b): SLN-, (c) und (d): NE-Formulierung.

Die Abbildung 4.11 beschreibt die Messergebnisse der durch Laserdiffraktometrie und mit Polarisationsintensitätsdifferentialstreuung (LD-PIDS) kombinierten Messmethode für die Partikelgrößenverteilungen der lipidbasierten Nanopartikel über die Zeit. Die SLN- und NE-Formulierungen sind mit jeweils 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA

beladen. Der arithmetische Mittelwert der SLN schwankt innerhalb von drei Monaten um 6 nm, während der arithmetische Mittelwert der NE innerhalb von elf Monaten um 5 nm variiert. Die Breite der Partikelgrößenverteilungen (siehe Gleichung 3.2.14) liegt bei den SLN zwischen 124 und 127 nm. Bei den NE zwischen 89 und 97 nm. Die Beladung mit bis zu 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA eignet sich gut für Zellkulturexperimente (ab Kapitel 4.4).

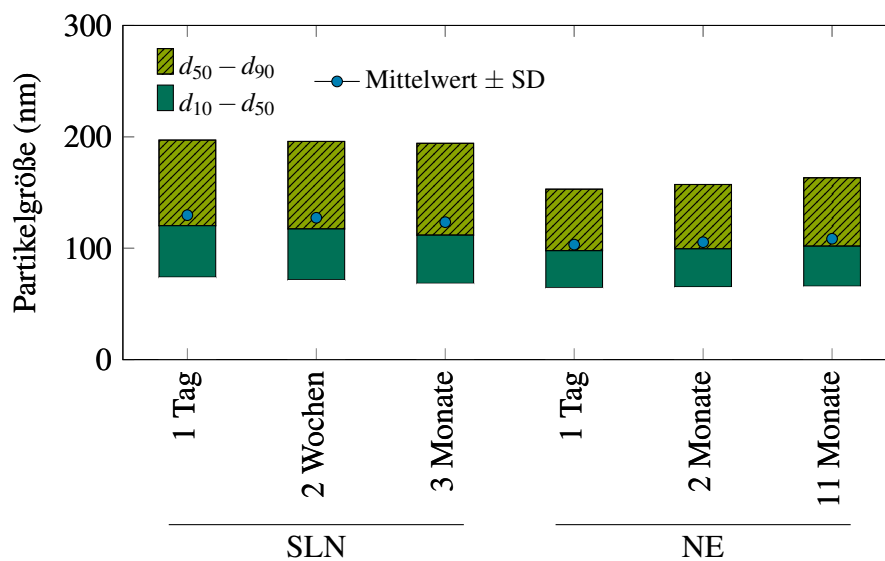


Abbildung 4.11: Partikelgrößenverteilungen der mit jeweils 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA beladenen SLN- und NE-Formulierungen über die Zeit, Lagertemperatur 8 °C ($n = 3$). Die Standardabweichungen (SD) sind mit < 1 nm kleiner als die Symbolgröße und deshalb nicht zu erkennen.

Die visuelle Auswertung der Partikelbewegung in Abbildung 4.12 konnte die Partikelgrößen aus Abbildung 4.11 für die SLN-Formulierung bestätigen. Die Abbildung 4.12 zeigt Standbilder mit einem Zeitabstand von 12,5 ms aus dem Video der Streulichtaufzeichnung der Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA). Die länglichen SLN-Partikel zeigen unterschiedliche Streulichtintensitäten, da sie dem Licht bei ihrer Rotation einmal die Draufsicht und damit die breite Plättchenform als Fläche präsentieren und manchmal nur die schmale, nadelförmige Seitenansicht. Zur Verdeutlichung

der Brown'schen Bewegung wurde ein Partikel innerhalb eines weißen Kreises zentriert und die vertikale Bewegung der Kreismarkierung durch zwei horizontale Linien hervorgehoben. Durch zeitliche Auswertung der Bewegung lässt sich für die Partikel in Abbildung 4.12 mit der Stokes-Einstein-Gleichung 3.2.13 eine Größe von 133 nm berechnen.

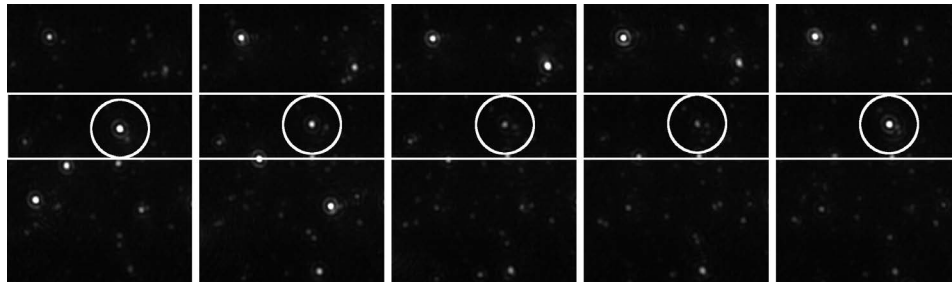


Abbildung 4.12: Standbilder in einem Abstand von 12,5 ms aus dem Video der Streulichtaufzeichnung der Nanopartikel-Tracking-Analyse (NTA) einer SLN-Formulierung. Zur Verdeutlichung ist die Bewegung von einem Partikel mit Hilfslinien und Kreisen hervorgehoben.

Diskussion

Die SLN entsprechen in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen den Darstellungen in der Literatur [133, 134]. Sie bilden plättchenartige, längliche Strukturen aus, was mit dem schichtartigen Aufbau der Triglyeridkristallite korrespondiert. Zusätzlich sind sie teilweise in sich verdreht.

Die Bilder der Nanoemulsion sind so orientiert, dass die hellen Bereiche oben liegen, damit die 3D-Visualisierung unseres Gehirns Berge und Täler besser unterscheiden kann - heller blauer Himmel ist in der Natur immer oben. Die ovalen, größeren Tröpfchen könnten den Moment der Koaleszenz zeigen oder durch das Zusammendrücken von großen Tröpfchen bei der Präparation entstanden sein (Abbildungsteil 4.10 (c)).

Des Weiteren sind in der Teilaufnahme 4.10 (c) nur Erhebungen zu sehen. Die Vermutung einer Eiskontamination der Probe kann aber durch einen anderen Ausschnitt der Probe widerlegt werden, da der Ausschnitt in Abbildungsteil 4.10 (d) neben Bergen auch Vertiefungen zeigt. Außerdem entsprechen die Berge im Abbildungsteil 4.10 (c)

den Tröpfchengrößen, wie sie auch in der Partikelgrößenanalyse gemessen wurden. Angemerkt sei noch, dass die Tröpfchen an unterschiedlichen Stellen brechen können und nicht nur mittig, was für eine Partikelgrößenanalyse optimal wäre. Damit ist eine quantitative Auswertung der Partikelgröße bei diesen Aufnahmen erst bei einer sehr hohen Anzahl von Partikeln sinnvoll.

Im Vergleich zu den SLN wirken die NE auf den TEM-Aufnahmen gleichmäßiger, was sich auch in der Partikelgrößenanalyse in Abbildung 4.11 bestätigte. Im Vergleich zu den festen Lipidnanopartikeln haben die Nanoemulsionen eine nochmals engere Partikelgrößenverteilung sowie eine geringere Schwankungsbreite des arithmetischen Mittelwerts über die Zeit. Eine mögliche Ursache hierfür wäre, dass die SLN nach der Herstellung noch auskristallisieren, was zu einer höheren Fluktuation der Partikelgrößen führt, wohingegen die Nanoemulsionen nach der Herstellung ihre Endgröße erreicht haben.

Die Ergebnisse mit dem LD-PIDS zeigen außerdem über mehrere Monate fast keine Veränderung der Partikelgröße, was auf eine hohe Lagerstabilität beider Formulierungen hindeutet. In der Literatur wurden unter optimalen Bedingungen (dunkel, 8 °C Lagertemperatur, siliconisiertes Glasvial) für die SLN schon Lagerstabilitäten von bis zu drei Jahren beschrieben [135].

Die SLN-Proben aus den DoE-Experimenten (35 Proben, 30 davon mit unterschiedlichen Prozessparametern) wurden ebenfalls eingelagert und die Partikelgrößen über 7 Monate regelmäßig bestimmt. Dabei war zu beobachten, dass Partikel mit einer Spanne (Gleichung 3.2.15) nahe eins im Mittel nicht größer als 140 nm waren und über den gesamten Zeitraum in ihrer Größe stabil blieben. SLN-Formulierungen mit einer breiteren Partikelgrößenverteilung neigten zur Ostwald-Reifung und damit zur Bildung von größeren Partikeln. Dieses Partikelwachstum ist allerdings auf die ungünstigen Prozessparameter bei einigen DoE-Versuchen zurückzuführen (siehe Kapitel 4.3.1) und betrifft nicht die im Folgenden verwendeten Formulierungen (vergleiche Abbildung 4.11).

4.3.3 HYP-DCHA Stabilität in der SLN-Formulierung

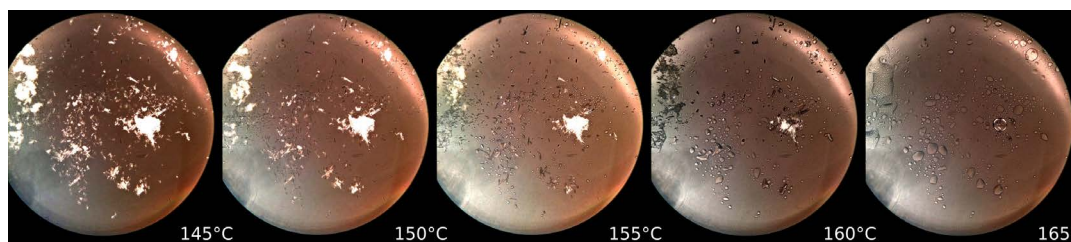
Die beiden lipidbasierten Formulierungen unterscheiden sich bei der Beladung mit HYP-DCHA deutlich voneinander. Aus diesem Grund werden sie in zwei getrennten Kapiteln betrachtet. Für die direkte Beladung der SLN-Formulierung wurde das HYP-DCHA in der 70 °C warmen Schmelze der Lipidmatrix (LM) unter Rühren gelöst (vergleiche Kapitel 3.2.3.3.4, Seite 61). Die im Anschluss erstarrte LM wurde zusammen mit der äußeren Phase eingewogen und erneut bei 70 °C aufgeschmolzen, voremulgiert (IKA Ultra-Turrax, 12,000 rpm, S 25 N - 10 G Dispergierwerkzeug, 10 s) und in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage (1240 bar, 3 Zyklen) zu einem nanoskaligen Arzneistoffträgersystem weiterverarbeitet. Um den Gehalt an HYP-DCHA in der SLN-Formulierung zu bestimmen, wurden die Proben, wie in Kapitel 3.2.4.7.1 (Seite 78) beschrieben, aufbereitet.

In allen auf diese Weise untersuchten Proben konnte mit der in Kapitel 3.2.4.7 beschriebenen HPLC-Methode kein HYP-DCHA detektiert werden. In den folgenden Unterkapiteln werden deshalb die Gründe für den vollständigen Verlust des HYP-DCHA genauer untersucht. Dafür wird die Herstellung in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage genauer betrachtet.

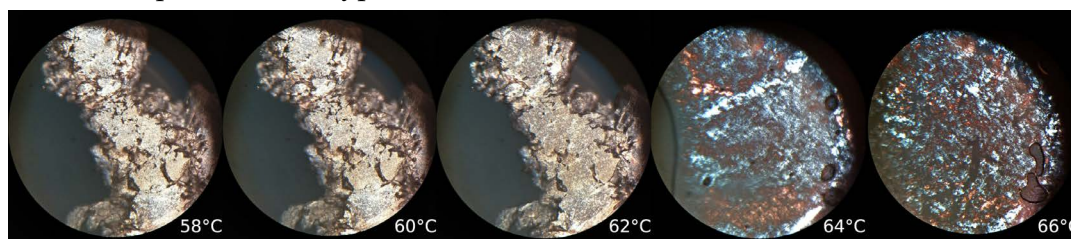
4.3.3.1 Schmelztemperatur der Lipidmatrix

Damit sich der Wirkstoff HYP-DCHA in der Lipidmatrix lösen kann, muss diese bei 70 °C aufgeschmolzen werden. Die durch dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) ermittelten Schmelzpunkte für die Lipidmatrix lagen bei 57,88 °C und die für HYP-DCHA bei 160,66 °C. Die Ergebnisse der DSC konnten mikroskopisch in Abbildung 4.13 bestätigt werden. Im oberen Abbildungsteil (a) ist das HYP-DCHA als kristallines Pulver zu erkennen, wie es bei ca. 160 °C schmilzt. Im unteren Abbildungsteil 4.13 (b) schmilzt die Lipidmatrix bei 64 °C.

Der Lösungsvorgang des HYP-DCHA in der Lipidmatrix ließ sich mit diesem Versuchsaufbau ebenfalls beobachten. Dafür wurden in die bei 70 °C aufgeschmolzene Lipidmatrix einige HYP-DCHA-Kristalle gegeben, die sich nach wenigen Sekunden auflösten.



(a) Schmelzprozess von Hyperforin-DCHA.



(b) Schmelzprozess der Lipidmatrix unter dem Polarisationsmikroskop.

Abbildung 4.13: Mikroskopieaufnahmen auf einem Heiztisch (Temperaturgradient von 30 bis 180 °C, 10 K/min.

Diskussion

Der Schmelzpunkt der Lipidmatrix ist niedrig genug, damit sich das HYP-DCHA in der Schmelze lösen kann, ohne selbst zerstört zu werden (vergleiche Kapitel 4.1). Bei einer Temperatur von 70 °C ist auch das eingesetzte Phospholipid für mindestens eine Stunde stabil [136].

Die feste Lipidmatrix lässt sich nicht vollständig plan auf dem Heizelement positionieren, weshalb es im Mikroskopieversuch zu einer schlechten Wärmeleitung und damit zu einer etwas erhöhten Schmelztemperatur im Vergleich zur DSC-Messung kommt. Der Hauptbestandteil der Lipidmatrix, das Hartfett, schmilzt unter dem Mikroskop bei 55 °C. Das Phospholipid besitzt aufgrund der unterschiedlichen Fettsäurezusammensetzung keinen charakteristischen Schmelzpunkt und zeigt im DSC-Diagramm ein thermischen Ereignis von ca. 32 bis 78 °C. Dabei bildet es flüssigkristalline Strukturen aus, die unter dem Polarisationsmikroskop in Abbildung 4.13 ab einer Temperatur von 64 °C zu erkennen sind.

4.3.3.2 Stabilität bei der Probenaufbereitung

Für die Analyse des HYP-DCHA-Gehaltes (siehe Kapitel 3.2.4.7) in den SLN-Formulierungen müssen in einem ersten Schritt die festen Lipid-Bestandteile der SLN-Formulierungen abgetrennt werden, um ein Verstopfen der HPLC-Säule zu vermeiden. Damit sichergestellt werden kann, dass bei dieser Probenaufbereitung kein HYP-DCHA verloren geht, wurden alle Arbeitsschritte für die Aufbereitung ohne Anwesenheit der SLN-Formulierung und nur mit einer ethanolischen HYP-DCHA-Lösung durchgeführt (Blindprobe). Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Kapitel 3.2.3.3.4 beschrieben.

Probenbezeichnung	WF HYP-DCHA \pm SD in %
Simulierte SLN-Aufbereitung ohne Chloroform	98,7 \pm 0,36
Simulierte SLN-Aufbereitung mit Chloroform	99,2 \pm 0,35

Tabelle 4.17: Wiederfindung (WF) HYP-DCHA. Stabilität des HYP-DCHA während der SLN-Probenaufbereitung (Proben hier ohne SLN-Formulierung, n = 3).

Die Versuchsergebnisse in Tabelle 4.17 zeigen, dass nach der Probenaufbereitung der Blindprobe nahezu das gesamte HYP-DCHA wiedergefunden wurde. Dabei wirken sich weder das Lösungsmittel Chloroform noch die einzelnen Arbeitsschritte wie beispielsweise das Zentrifugieren der Probe negativ auf die HYP-DCHA-Stabilität aus.

Eine zweite Fragestellung bei der Probenaufbereitung betrifft den Verteilungskoeffizienten des HYP-DCHA zwischen dem Präzipitat und dem Extraktionsmittel Ethanol. Wenn ein großer Anteil in der ausgefallenen Lipidmatrix zurück bleibt, dann müsste die Extraktion mehrfach wiederholt, der Überstand jedes Mal einzeln analysiert und die Flächen in der HPLC-Analytik am Ende aufaddiert werden. Eine Wiederholung der Probenaufbereitung bei einer zuvor ausgefallenen Probe konnte aber zeigen, dass durch das erneute Auflösen und Ausfällen der Lipidmatrix nur zusätzliche 1,9 % (\pm 0,15 %, n = 4) des eingesetzten HYP-DCHA im zweiten Überstand bestimmt werden konnten.

Diskussion

Die Versuchsergebnisse in Tabelle 4.17 zeigen, dass durch die Arbeitsschritte der Probenaufbereitung keine Beeinflussung der HYP-DCHA-Konzentration in den Proben zu erwarten ist. Der Verteilungskoeffizient ist zu Gunsten des Extraktionsmittels verschoben, weshalb eine einmalige Extraktion mit Ethanol ausreichend ist und unter 2 % des HYP-DCHA im Präzipitat zurückbleiben. Dementsprechend müsste in den beladenen SLN-Formulierungen ein Großteil an HYP-DCHA wiedergefunden werden. Im nächsten Kapitel wird klar, wieso trotzdem kein HYP-DCHA in den SLN-Proben detektiert werden konnte.

4.3.3.3 Prozessverlust

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der Herstellungsmethode (Kapitel 3.2.3.3.1) auf die Stabilität des HYP-DCHA untersucht. Damit die SLN-Formulierungen mit der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage verarbeitet werden können, muss die Lipidmatrix flüssig vorliegen und damit die gesamte Formulierung auf 70 °C erwärmt werden.

Lagerzeit in Stunden	HYP-DCHA-Wiederfindung \pm SD in %
0,0	107,12 \pm 0,68
0,5	11,94 \pm 8,36
1,0	2,82 \pm 1,63
3,0	< LOD

Tabelle 4.18: HYP-DCHA-Wiederfindung (10 μ mol/l) in der SLN-Voremulsionen bei 70 °C auf einer Heizplatte über die Zeit (n = 3).

Die Tabelle 4.18 zeigt den Anteil des HYP-DCHA, welches nach unterschiedlichen Zeiten in der aufgeschmolzenen Voremulsion wiedergefunden wurde. Ohne Temperatureinwirkung wird das gesamte eingesetzte HYP-DCHA detektiert, aber schon nach 30 Minuten liegt der Anteil an wiedergefundenem HYP-DCHA unter 12 %. Die Menge an HYP-DCHA konvergiert über die Zeit gegen Null und ist nach drei Stunden nicht mehr nachweisbar (< LOD, limit of detection, siehe Kapitel 3.2.4.7).

Durch die hohen Drücke in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage treten neben

den thermischen auch mechanische Belastungen für die kolloidalen Systeme auf. Innerhalb eines Zyklus und bei einem Druck von 1240 bar erwärmt sich die gesamte Formulierung von 19 auf 39 °C. Nach einem zweiten Zyklus beträgt die Temperatur der Formulierung 41 °C, nach drei Zyklen 42 °C. Die 15 ml pro Probe passieren die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage innerhalb von ca. 2 Sekunden und erwärmen sich dabei entsprechend um über 20 K. Zusammen mit der Wärmekapazität von flüssigem Wasser $c = 4,182 \text{ kJ/kg} \cdot \text{K}$ und der Masse der Formulierung von $m = 0,015 \text{ kg}$ ergibt dies nach Gleichung 4.3.3 einen Wärmestrom von 627 Watt. Da der massive Stahlblock, in dem der Mikrokanal eingespannt ist, eine ca. 30 Mal höhere Wärmeleitfähigkeit als Wasser besitzt und die Formulierung damit folglich wieder abkühlt, ist die tatsächlich eingebrachte Leistung und damit die Temperatur wahrscheinlich deutlich größer.

$$\dot{Q} = \frac{m \cdot c \cdot \Delta T}{t} = \frac{0,015 \text{ kg} \cdot 4,182 \text{ kJ/kg} \cdot \text{K} \cdot 20 \text{ K}}{2 \text{ s}} = 0,627 \text{ kJ/s} = 627 \text{ W} \quad (4.3.3)$$

Die auflichtmikroskopischen Darstellungen des Mikrokanals in Abbildung 4.14 zeigen oxidationsbedingte Verfärbungen, die im Zusammenhang mit erhöhten Temperatureinwirkungen bei einem Druck von über 1200 bar an der Engstelle des Mikrokanals entstehen. Die Mikrokanäle in Abbildung 4.14 sind so ausgerichtet, dass die Formulierung von links nach rechts durch die Mikrokanäle gepresst wurde. Im Vergleich zum neuen Kanal in Abbildungsteil 4.14 (a) sind in Abbildungsteil 4.14 (b) die Anlauffarben des Metalls am Beginn der Verengung gut zu erkennen. Die Verfärbungen der Metalloberfläche sind auch mit bloßem Auge sichtbar, werden aber erst unter dem Mikroskop differenzierbar. Die durch Oxidation an der Metalloberfläche entstandenen Anlauffarben hängen von der Dicke der Oxidationsschicht ab. Je nach vorherrschender Temperatur können die Sauerstoffatome in tiefere Schichten vordringen, weshalb sich anhand der Anlauffarben auch die Temperatur bestimmen lässt, die auf den Mikrokanal eingewirkt hat. In dem Tabellenbuch *Metall* von Ulrich Fischer [137] werden bläuliche Verfärbungen bei unlegiertem Werkzeugstahl bei Temperaturen von 300 °C erreicht.

Als Nachweis, dass die Verfärbungen des Mikrokanals auf einen Temperatureinfluss

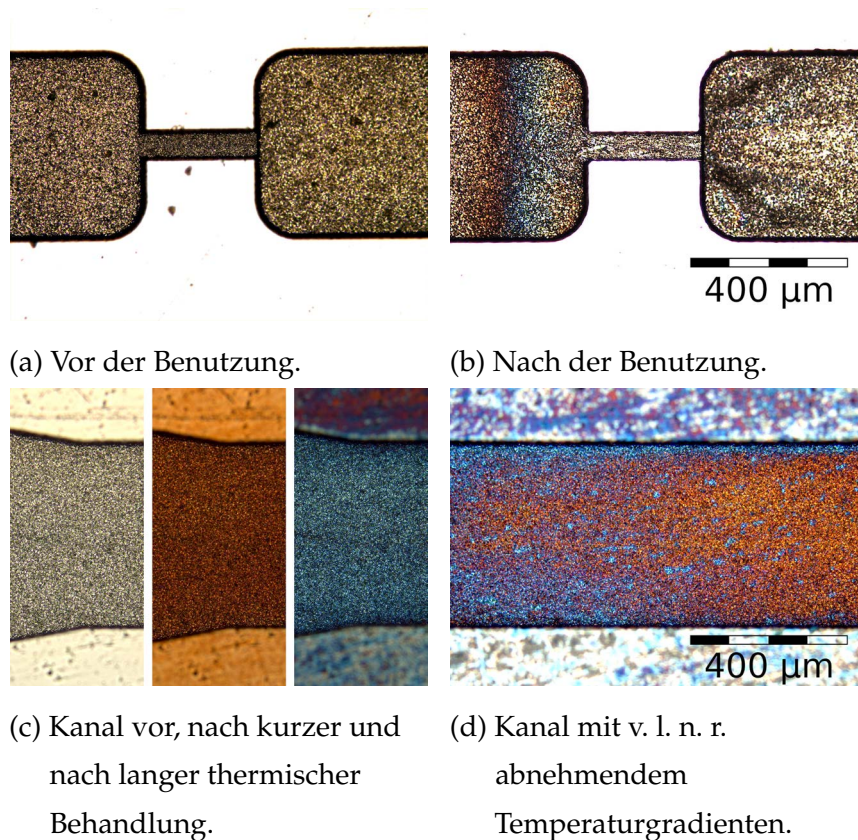


Abbildung 4.14: Mikroskopische Auflichtaufnahmen von Mikrokanälen mit Anlauffarben.

zurückzuführen sind, wurde ein alter Mikrokanal über einer Bunsenbrennerflamme bis zur Rotglut (ca. 500 °C) erhitzt. Aufgrund der aufwändigen Herstellung konnte kein neuer Mikrokanal für diese Untersuchung verwendet werden. Der für die Anlauffarbe gewählte Kanalabschnitt liegt nahe am Einlass und damit maximal von der Engstelle entfernt, weshalb der Kanalabschnitt einem neuen Kanal sehr ähnelte.

In Abbildungsteil 4.14 (c) ist die Verfärbung nach der Temperaturbehandlung von einem ursprünglich metallisch hellem Erscheinungsbild zu einer rötlichen Farbe gut zu erkennen. Durch die erneute Erwärmung des Kanals mit einem Bunsenbrenner, dieses Mal bis auf ca. 800 °C, konnte eine blaue Anlauffarbe erzeugt werden, die ebenfalls gut in Abbildungsteil 4.14 (c) zu erkennen ist. Die Belichtung in allen drei Teilaufnahmen von Abbildungsteil (c) ist konstant, wodurch eine quantifizierte Aus-

sage der Farbtemperatur möglich ist. In Abbildungsteil 4.14 (d) ist ein mit einem Bunsenbrenner erzeugter von links nach rechts abnehmender Temperaturgradient gezeigt. Die heißesten Stellen sind wieder blau angelaufen, die etwas kühleren gelb bis rot. Die Farben sind in weniger ausgeprägter Form in dem durch normale Benutzung angelaufenen Kanal in Abbildungsteil 4.14 (b) wiederzuerkennen.

Diskussion

Die im ersten Abschnitt untersuchten Voremulsionen zeigten, dass das HYP-DCHA in der Voremulsion bei 70 °C instabil ist und deshalb nur sehr kurz auf die zur Verarbeitung notwendige Temperatur erwärmt werden darf. Aufgrund der über 100 %, die in den Voremulsionen wiedergefunden wurden, muss davon ausgegangen werden, dass es bei der Aufbereitung der Proben zu einer Aufkonzentration gekommen ist. Die Aussage der Instabilität über die Zeit bei 70 °C bleibt erhalten.

Die Anlauffarben der Mikrokanäle lassen auf eine sehr hohe Temperatur bei der Probenherstellung schließen. Eine Verschmutzung als Grund für die Anlauffarben kann nahezu ausgeschlossen werden, da die Kanäle im Vorfeld mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (Wasser, Isopropanol, Chloroform) intensiv gereinigt wurden. Die Untersuchung weiterer, alter Mikrokanäle hat gezeigt, dass auch diese Anlauffarben kurz vor der Engstelle aufweisen. Die genauen Temperaturen für die resultierenden Farben können nicht exakt festgelegt werden, da diese zwischen unterschiedlichen Legierungen variieren und nicht für die der Mikrokanäle (X10CrNi18-8, einem austenitischen Chrom-Nickel-Stahl) definiert sind. Die bläulichen Anlauffarben entstehen allerdings nur bei hohen Temperaturen von ca. 300 °C. Wasser wechselt bei 374,12 °C und einem Druck von 221 bar (kritischer Punkt) in den überkritischen Zustand. Es kann auf Grundlage der Anlauffarben spekuliert werden, ob dies auch im Mikrokanal der Fall ist. Darüber hinaus könnte die Oxidation der Metalloberfläche auch durch die in der Formulierung enthaltenen Lipide begünstigt werden, da diese sich bei hohen Temperaturen durch Autoxidation zersetzen und dabei Radikale bilden (siehe Kapitel 5.2.1).

Als austenitischer Chrom-Nickel-Stahl ist die kubisch-flächenzentrierte Modifikation des Eisens und seiner Mischkristalle in ihrer charakteristischen Struktur [137]

gut im Auflichtmikroskop zu erkennen. Durch Kavitationsfraß ist diese Struktur in Abbildungsteil 4.14 (b) deutlich rauer, als im neuen Kanal in Abbildungsteil 4.14 (a). Durch die Kräfte der Implosion von Kavitationsblasen kommt es zur oberflächlichen Ablösung einzelner Metallschichten, die mit der Zeit zu einer Vergrößerung der Oberfläche und damit zum Verschleiß der Mikrokanäle führen. Diese Kräfte wirken sich wahrscheinlich ebenfalls negativ auf die HYP-DCHA-Stabilität aus, fördern aber die Zerteilung der inneren Phase.

4.3.3.4 Stabilität in der Lipidmatrix

Da in der SLN-Formulierung kein HYP-DCHA detektiert wurde und die Probenaufbereitung keinen Einfluss auf die HYP-DCHA-Stabilität hatte, soll im Folgenden untersucht werden, wie sich das HYP-DCHA in der Lipidphase der SLN-Formulierung verhält. Zur Quantifizierung der HYP-DCHA-Stabilität in der reinen Lipidmatrix (LM), also ohne äußere Phase, wurde diese bei 70 °C aufgeschmolzen und mit 10 µmol/l HYP-DCHA beladen. Nach dem Erstarren der Lipidmatrix konnte diese, wie in Kapitel 3.2.4.7.1 beschrieben, für die HPLC-Analyse aufbereitet und analysiert werden.

Lagerzeit in Tagen	HYP-DCHA-Wiederfindung \pm SD in %
0	60,87 \pm 2,67
1	43,11
2	40,40
3	41,93
6	36,62
9	29,25

Tabelle 4.19: HYP-DCHA-Wiederfindung (10 µmol/l) in der Lipidmatrix, gelagert bei 8 °C (n = 1, 0 Tage n = 3).

Untersucht wurde die Lagerstabilität über 9 Tage bei dunklen Lagerbedingungen und einer Temperatur von 8 °C. Direkt nach der Herstellung konnten, wie der Tabelle 4.19 zu entnehmen ist, nur 60,87 % des eingesetzten HYP-DCHA detektiert werden. Innerhalb der ersten 24 Stunden wurden weitere 18 % des HYP-DCHA abgebaut, danach ging die Degradation des Wirkstoffes in einen linearen Verlauf über. Pro

Tag kam es im Durchschnitt zu einem HYP-DCHA-Verlust von 1,4 %. Nach 9 Tagen konnten nur noch etwa 50 % der direkt nach der Herstellung bestimmten HYP-DCHA-Konzentration wiedergefunden werden.

Diskussion

Da die Einarbeitung des HYP-DCHA in die 70 °C heiße Lipidschmelze erfolgte, ist es aufgrund der Erfahrungen aus dem vorherigen Kapitel 4.3.3.3 nicht verwunderlich, dass auch direkt nach dem Erstarren der Schmelze nur 60,87 % des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden wurden.

Innerhalb der ersten 24 Stunden wurden noch einmal fast 18 % des HYP-DCHA abgebaut. Dies ließe sich mit der Vermutung erklären, dass ein Teil des Wirkstoffs an die Oberfläche der Lipidmatrix angelagert wird und dort durch die Exposition von Licht und Sauerstoff oxidiert.

Ein weiterer Erklärungsgrund für die fortlaufende Degradation des HYP-DCHA könnten die nach der Herstellung auskristallisierenden Lipide sein. Durch die Rekristallisation kommt es zu einer hohen Ordnung der Lipid-Moleküle, was in einem verminderten Platzangebot des Wirkstoffs resultiert. Bezogen auf den Gehalt an Matrixlipiden können in der Regel weniger als 5 - 10 % Wirkstoff in den festen Lipiden inkorporiert werden. Der restliche Wirkstoff, der vorher in dem flüssigen Lipid gelöst vorlag, wird an die Grenzfläche gedrückt, wo er abermals der Exposition von Licht und Sauerstoff ausgesetzt ist [75, 76]. Dieser Effekt kann die geringe Hyperforinstabilität in der Lipidmatrix aber auch nur zum Teil erklären, da die Beladung mit 10 µmol/l HYP-DCHA gerade einmal einen Anteil von 0,006 % in der Lipidphase ausmacht. Damit sollte auch in der festen, kristallinen Form noch genug Platz für den Wirkstoff vorhanden sein.

Wahrscheinlich ist die geringe Wiederfindung mit einer Kombination verschiedener Effekte (hohe Temperatur in der Schmelze, Wirkstoffanlagerung an die Lipidoberfläche, Wirkstoffanlagerung an die Lipidoberfläche bei der Lipidkristallisation) zu erklären.

4.3.4 HYP-DCHA-Stabilität in der NE-Formulierung

Nach den Betrachtungen der HYP-DCHA-Stabilität der SLN-Formulierungen wurde im Folgenden der Einfluss von Nanoemulsionen auf das HYP-DCHA untersucht. Für die Beladung der NE-Formulierungen wurde das HYP-DCHA direkt in die bei Raumtemperatur flüssigen, mittelkettigen Triglyceride eingewogen. Da der Lipidanteil in den NE-Formulierungen nicht bei 70 °C aufgeschmolzen werden musste, war die thermische Belastung für das Hyperforinmolekül deutlich geringer. Die Lipidphase wurde zusammen mit der äußeren, wässrigen Phase voremulgiert und dann mit der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage zu der eigentlichen Nanoemulsion weiterverarbeitet (Methode: siehe Kapitel 3.2.3.3.2).

In den untersuchten NE-Formulierungen konnten 46,15 % ($\pm 10,55$ %) des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden werden (Tabelle 4.20). Im Vergleich zum vorherigen Kapitel sind die Nanoemulsionen damit deutlich besser für die direkte Beladung des HYP-DCHA geeignet als die SLN. Nach einer Woche verringerte sich der wiedergefundene Anteil an HYP-DCHA um etwa 7,5 %, eine Größenordnung, die bei der Lipidmatrix der SLN-Formulierung schon innerhalb von 24 Stunden erreicht wurde.

Lagerzeit in Tagen	HYP-DCHA-Wiederfindung \pm SD in %
0	46,15 \pm 10,55
5	42,35 \pm 10,32
8	38,67 \pm 9,21
11	34,97 \pm 7,90

Tabelle 4.20: HYP-DCHA-Wiederfindung (10 μ mol/l) in Nanoemulsionen, gelagert bei 8 °C (n = 5).

Diskussion

Die Nanoemulsionen haben gegenüber den festen Lipidnanopartikeln mehrere Vorteile. Da das Lipid in den NE-Formulierungen bei Raumtemperatur flüssig vorliegt, entfällt die aufwändige Beheizung der gesamten Mikrokanalhochdruckemulgieranlage. Außerdem ist die Temperaturbelastung für das thermisch instabile HYP-DCHA

geringer. Zusätzlich ist keine Probenvorbereitung für die HPLC-Analyse notwendig, da dass flüssige Lipid in der NE-Formulierung die HPLC-Säule passieren kann. Nachteilig bei der HPLC-Methode ist die Eigenabsorption der mittelkettigen Triglyceride, die aber durch eine geeignete Kalibriergerade ausgeglichen werden konnte (siehe Methodenkapitel 3.2.4.7.2).

Ein Grund für die dennoch relativ geringen Wiederfindungen in den NE-Formulierungen könnten die großen Belastungen in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage während der Herstellung sein. Diese als Prozessverlust beschriebenen Vorgänge wurden schon bei den SLN-Formulierungen diskutiert (ab Seite 138). Als Ergänzung zur Tabelle 4.20 ist auch die Untersuchung in Tabelle 4.22, Kapitel 4.3.5.3 mit 0 % BSA zu beachten. Die Bedingungen waren bei beiden Versuchsreihen identisch und aufgrund der ähnlichen Wiederfindungen über die Zeit kann die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bestätigt werden.

4.3.5 Bovines Serumalbumin als Stabilisator

Wie in Kapitel 4.2 gezeigt werden konnte, hat Bovines Serumalbumin (BSA) eine stabilisierende Wirkung auf HYP-DCHA. In den nachfolgenden Versuchen wurde untersucht, inwieweit sich diese positive Eigenschaft auf die Stabilisierung von HYP-DCHA in lipidbasierten Nanopartikeln übertragen lässt. Für diesen Zweck wurde in die äußeren Phasen der SLN- und NE-Formulierungen 1 % BSA eingearbeitet.

Für Experimente in der Zellkultur (Kapitel 4.4) war es notwendig, die wässrige, äußere Phase gegen das Kulturmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) auszutauschen. Ein wichtiger Zusatz in diesem Medium ist das Fetale Kälberserum (fetal calf serum, FCS), welches als Hauptprotein BSA enthält und deshalb thematisch diesem Kapitel zugeordnet wurde. Aufgrund der Tatsache, dass DMEM + FCS kein definiertes Medium ist, kann die BSA-Konzentration im FCS nur mit einem mittleren Wert von 2,3 % angegeben werden. (siehe Kapitel 3.1.4.2, Seite 45). Der Anteil an FCS im DMEM war mit 10 % in allen Versuchen konstant. Dementsprechend wird in den nachfolgenden Ergebnissen bei DMEM + FCS als äußere Phase von einer BSA-Konzentration von 0,23 % ausgegangen.

4.3.5.1 Partikelgrößenstabilität

Die erste Hälfte der Abbildung 4.15 zeigt die am LD-PIDS vermessenen Partikelgrößenverteilungen für die SLN-Formulierungen über eine Zeit von drei Monaten. Die Formulierungen sind mit jeweils 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA beladen. Die mit BSA gekennzeichneten Formulierungen beinhalten zusätzlich 1 % BSA in der äußeren Phase. Die mit DMEM umschriebenen Formulierungen haben eine äußere Phase aus DMEM + FCS. Der arithmetische Mittelwert aller SLN-Formulierungen schwankt um maximal 13 nm. Die Breite der Partikelgrößenverteilungen (nach Gleichung 3.2.14) liegt bei allen sechs Datensätzen zwischen 104 und 127 nm. Insgesamt ist die Partikelgrößenverteilung bei den SLN-Formulierungen breiter als bei den NE-Formulierungen (vergleiche Kapitel 4.3.2).

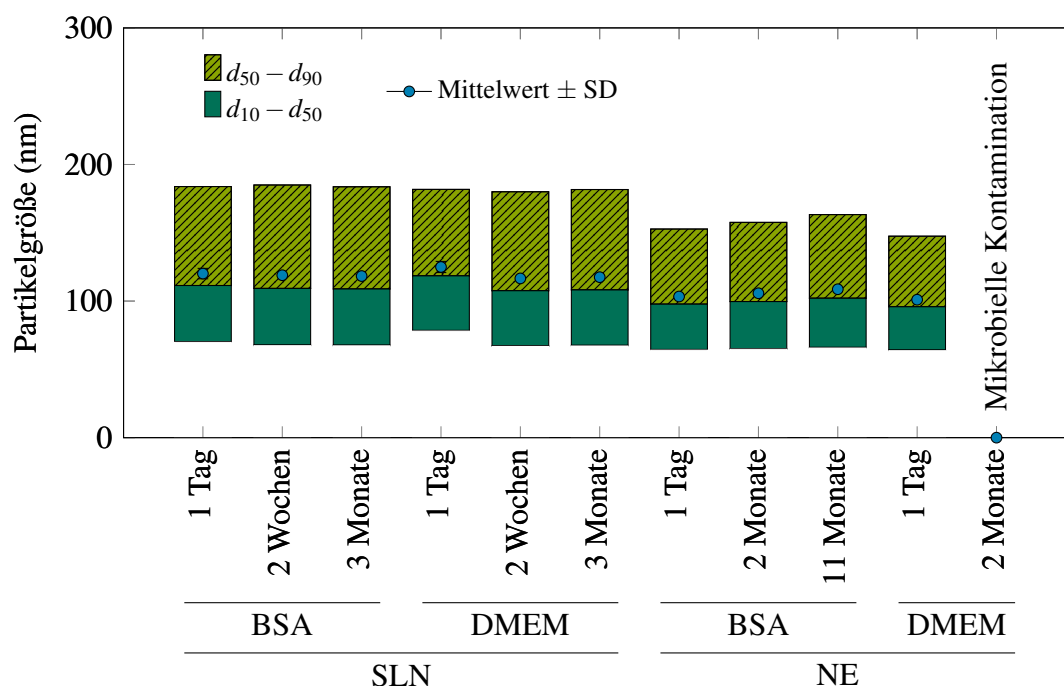


Abbildung 4.15: SLN Partikelgrößenverteilungen für beladene SLN mit jeweils 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA in unterschiedlichen äußeren Phasen über die Zeit ($n = 3$). BSA = mit 1 % BSA, DMEM = mit DMEM + 10 % FCS.

Die zweite Hälfte der Abbildung 4.15 beinhaltet die am LD-PIDS vermessenen Par-

tikelgrößenverteilungen der NE-Formulierungen. Diese sind ebenfalls mit 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA beladen und für die beiden unterschiedlichen äußeren Phasen dargestellt. Der arithmetische Mittelwert aller NE-Formulierungen schwankt über elf Monate um maximal 5 nm. Die Breite der Partikelgrößenverteilungen (nach Gleichung 3.2.14) liegt bei allen Daten zwischen 83 und 97 nm. Die Partikelgröße in der NE-Formulierung mit DMEM + FCS konnte nach zwei Monaten nicht mehr bestimmt werden. Aufgrund der guten Wachstumsbedingungen im DMEM sind in allen drei Probengefäßen Mikroorganismen gewachsen. Die Standardabweichungen (SD) sind mit < 4 nm kleiner als die Symbolgröße und deshalb nicht in der Abbildung 4.15 zu erkennen.

Diskussion

Die Größenordnung und auch die Breite der Partikelgrößenverteilungen wurden durch die veränderten äußeren Phasen nicht beeinflusst (vergleiche Abbildung 4.11 ohne BSA in der äußeren Phase). Über die Zeit von drei bzw. elf Monaten blieb die Partikelgröße in allen Formulierungen konstant. Erneut zeichnen sich die NE durch eine enge Partikelgrößenverteilung aus (vergleiche Kapitel 4.3.2).

Die Herstellung der SLN- und NE-Formulierungen fand zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Da es nicht Ziel war, die Lagerbedingungen der lipidbasierten Nanopartikel systematisch zu untersuchen, unterscheiden sich die Messzeiträume zwischen den Formulierungen. Diese Tatsache verhindert einen direkten Vergleich der Partikelgrößen untereinander. Es wurde aber in keiner der Formulierungen ein Partikelwachstum über mehrere Nanometer beobachtet. Alle Formulierungen waren innerhalb der chemischen Stabilitätsuntersuchungen des HYP-DCHA von maximal einem Monat in ihrer Partikelgröße stabil. Die mikrobielle Kontamination der Proben mit DMEM + FCS als äußerer Phase wird erst nach mehreren Wochen problematisch. Während der chemischen Stabilitätsuntersuchungen des HYP-DCHA über einen Zeitraum von maximal einem Monat konnte kein mikrobielles Wachstum beobachtet werden. Um dieses grundsätzlich zu vermeiden, könnte unter aseptischen Bedingungen gearbeitet werden. Auch eine Konservierung beispielsweise mit Thiomersal wäre denkbar, sofern die Formulierung nicht mehr in der Zellkultur zum Einsatz kommt.

4.3.5.2 HYP-DCHA-Stabilität in der SLN-Formulierung

Durch den Zusatz von 1 % BSA in der äußeren Phase konnte zum ersten Mal HYP-DCHA in einer SLN-Formulierung nachgewiesen werden. Der wiedergefundene Anteil an HYP-DCHA betrug 11,08 % ($\pm 7,05$ %), wie der Tabelle 4.21 zu entnehmen ist. Um den positiven Einfluss von BSA auf das HYP-DCHA weiter zu steigern, wurde die BSA-Konzentration in der äußeren Phase bis auf 5 % erhöht. Das BSA erhöht dabei aber die Viskosität der äußeren Phase, womit die maximale BSA-Konzentration limitiert wird. Ein Anteil von 7 % BSA lässt sich schon nicht mehr mit der Mikrokanal-hochdruckemulgieranlage verarbeiten.

Lagerzeit in Tagen	BSA Konzentration in %				
	0	1	3	5	DMEM + FCS
1	< LOD	11,08 \pm 7,05	8,69 \pm 0,69	6,24 \pm 1,19	22,82 \pm 4,32
4	< LOD	< LOD	< LOD	3,53 \pm N/A	N/A
11	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	11,88 \pm 2,93

Tabelle 4.21: HYP-DCHA-Wiederfindung (10 μ mol/l) in SLN-Formulierungen mit fünf unterschiedlichen äußeren Phasen über die Zeit, Lagertemperatur 8 °C (n = 3, N/A: nicht vorhanden).

Die Erhöhung der BSA-Konzentration in der äußeren Phase hatte nach einem Tag keine höhere Wiederfindung von HYP-DCHA bewirkt. Die Anteile des wiedergefundene HYP-DCHA sind mit steigender BSA-Konzentration sogar gesunken. Nach vier Tagen konnte allerdings in der Formulierung mit 5 % BSA in der äußeren Phase HYP-DCHA detektiert werden. Im Vergleich zur Formulierung mit 1 % BSA in der äußeren Phase ist die Wiederfindung in der SLN-Formulierung mit DMEM + FCS als äußere Phase doppelt so hoch. Die Analyse des HYP-DCHA-Gehaltes nach elf Tagen zeigte ebenfalls, dass nur in der Formulierung mit DMEM + FCS als äußere Phase noch HYP-DCHA bestimmbar war.

Die Anteile des wiedergefundene HYP-DCHA stammen alle aus der lipidhaltigen, inneren Phase. Um dies zu verifizieren, kamen Centrisarts[®] zum Einsatz (siehe Kapitel 3.2.4.7.3). In diesen wurde jeweils ein halber Milliliter der äußeren Phase durch

Anlegen einer Zentrifugalkraft von der Formulierung abgetrennt. Da in keinem der Filtrate HYP-DCHA gefunden werden konnte, ist davon auszugehen, dass das HYP-DCHA, welches in Tabelle 4.21 aufgelistet ist, vorher ausschließlich in der inneren, lipidhaltigen Phase lokalisiert war.

Diskussion

Wie schon aus dem vorherigen Kapitel 4.3.3 bekannt, lässt sich in SLN-Formulierungen ohne BSA in der äußeren Phase nach einem Tag kein HYP-DCHA mehr nachweisen. Bei Anwesenheit von BSA war das HYP-DCHA etwas stabiler (siehe Tabelle 4.21). Nach vier Tagen konnte bei 5 % BSA in der äußeren Phase in einer der drei Proben noch HYP-DCHA nachgewiesen werden. Aus diesem Grund existiert in der Tabelle 4.21 auch keine Standardabweichung für diesen Wert.

Es könnte erwartet werden, dass eine Erhöhung der BSA-Konzentration in der äußeren Phase mit einer höheren Wiederfindung an HYP-DCHA korreliert oder die Wiederfindung zumindest bei steigender BSA-Konzentration konstant bleibt. Dass dies hier nicht so ist und die Wiederfindung von 11,08 % bei 1 % BSA in der äußeren Phase zu 6,24 % bei 5 % BSA in der äußeren Phase sinkt, könnte mit den Erkenntnissen aus Kapitel 4.3.3.3 erklärt werden. Alle SLN-Voremulsionen wurden zeitgleich aufgeschmolzen, um sie für die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage vorzubereiten. Beginnend mit den Proben ohne BSA in der äußeren Phase wurden alle Voremulsionen nacheinander verarbeitet. Dadurch waren die ersten Proben ohne BSA der thermischen Belastung von 70 °C für ca. 15 Minuten ausgesetzt, wohingegen die letzten Proben mit 5 % BSA in der äußeren Phase über zwei Stunden bei 70 °C temperiert wurden.

Aufgrund dessen kann dieses Experiment mit Tabelle 4.18 aus Kapitel 4.3.3.3 verglichen werden. In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass die Wiederfindung von HYP-DCHA in einer bei 70 °C temperierten SLN-Voremulsion schon nach 30 Minuten auf ca. 12 % sinkt und nach einer Stunde bei etwa 3 % liegt. Durch die in Tabelle 4.21 dargestellten verhältnismäßig hohen HYP-DCHA-Wiederfindungen lässt sich vermuten, dass BSA in der äußeren Phase das HYP-DCHA in einem begrenzten Ausmaß vor thermischer Belastung schützen kann.

Für konkrete Aussagen über die Stabilität des HYP-DCHA in Kombination mit der

BSA-Konzentration müsste dieser Versuch unter kontrollierten, thermischen Bedingungen wiederholt werden. Infolge der geringen Wiederfindung von HYP-DCHA wurde eine Wiederholung allerdings nicht angestrebt. Stattdessen wurde der Beladungsprozess im nächsten Kapitel (ab Seite 152) angepasst.

Die Proben mit DMEM + 10 % FCS als äußere Phase wurden unabhängig von den anderen Proben hergestellt und untersucht. Deshalb lag die thermische Belastung von 70 °C nur bei etwa 15 Minuten. Daraus resultiert wahrscheinlich die hohe HYP-DCHA-Wiederfindung von 22,82 % nach einem Tag. Die Wiederfindung nach vier Tagen wurde nicht gemessen (N/A, not available). Nach elf Tagen hat sich die wiedergefunden Menge an HYP-DCHA auf 11,88 % halbiert. Ein direkter Vergleich ist aufgrund der gleichen thermischen Belastungen nur mit den Formulierungen mit 1 % BSA in der äußeren Phase möglich. Die Wiederfindung von HYP-DCHA ist in den Formulierungen mit DMEM + FCS mehr als doppelt so hoch wie in der mit 1 % BSA in der äußeren Phase und das, obwohl die BSA-Konzentration in der DMEM + FCS-Phase nur 0,23 % betrug. Dies bedeutet, dass in dem komplexen Medium noch andere Bestandteile enthalten sein müssen, die die Stabilität des HYP-DCHA fördern.

4.3.5.3 HYP-DCHA-Stabilität in den NE-Formulierungen

In Tabelle 4.22 ist die Lagerstabilität des HYP-DCHA in Nanoemulsionen mit drei unterschiedlichen äußeren Phasen dargestellt. In den Proben mit 1 % BSA bzw. mit DMEM + FCS konnten im Vergleich zu den Proben ohne BSA in der äußeren Phase 37 bzw. 28 % mehr HYP-DCHA wiedergefunden werden. Erwähnenswert ist die hohe Standardabweichung der Proben, besonders beim DMEM + FCS (siehe Diskussion). Der Anteil des wiedergefundenen HYP-DCHA ohne BSA nimmt über 31 Tage von anfänglich 49 auf 30 % ab. Der Anteil in der Formulierung mit 1 % BSA sinkt von 86 auf 65 %. Die wiedergefundenen Anteile von HYP-DCHA in den Proben mit DMEM + FCS als äußere Phase bleiben relativ konstant bzw. steigen leicht.

Lagerzeit in Tagen	BSA Konzentration in %		
	0	1	DMEM + FCS
0	48,61 ± 10,04	85,70 ± 14,08	76,55 ± 22,04
1	36,64 ± 8,66	71,90 ± 3,64	76,83 ± 21,47
24	39,40 ± 8,40	64,10 ± 20,85	83,36 ± 25,40
31	29,91 ± N/A	64,84 ± 19,87	85,04 ± 24,18

Tabelle 4.22: HYP-DCHA-Wiederfindung in NE (10 µmol/l HYP-DCHA) mit drei unterschiedlichen äußeren Phasen über die Zeit, gelagert bei 8 °C (n = 3, N/A: nicht vorhanden).

Diskussion

Der Anteil des wiedergefundenen HYP-DCHA in den NE-Formulierungen in Tabelle 4.22 sinkt bei den Proben ohne BSA in der äußeren Phase innerhalb eines Monats um 38 % (19 %-Punkte) auf 29,91 %. Mit 1 % BSA in der äußeren Phase verringert sich die Wiederfindung über diesen Zeitraum um 24 % (21 %-Punkte) auf 64,84 %. Bei den Proben mit DMEM + FCS in der äußeren Phase scheinen die Wiederfindungen über die Zeit sogar leicht anzusteigen und liegen nach einem Monat bei 85,04 %. Dieser Trend ist aber aufgrund der großen Standardabweichung von ca. ± 23 % nicht aussagekräftig.

Die zweistellige Standardabweichung lässt sich zum größten Teil durch die stark schwankenden Ausgangskonzentrationen erklären. Die Wiederfindung in den drei DMEM + FCS-Proben lag direkt nach der Herstellung in Probe 1 bei 51 %, in Probe 2 bei 88 % und in Probe 3 bei 90 %. Nach 31 Tagen sind die Wiederfindungen in allen drei Proben angestiegen. In Probe 1 stieg die HYP-DCHA-Wiederfindung auf 57 %, in Probe 2 auf 97 % und in Probe 3 auf 101 %. Die Proben wurden in Schraubdeckelgläschen gelagert, die für jede Messung erneut geöffnet wurden. Dabei kann es durch Verdunstung zu Aufkonzentrationen gekommen sein, wodurch sich die steigende Wiederfindung erklären ließe.

Die Formulierungen ohne BSA in der äußeren Phase schwankten nach der Herstellung ebenfalls in der HYP-DCHA-Wiederfindung von 38 bis 57 %. Bei den Formulierungen mit 1 % BSA in der äußeren Phase kam es zu Fluktuationen von 75 bis 96 %

in der Wiederfindung des HYP-DCHA. Weshalb die Beladung bei manchen Proben besser und bei anderen weniger gut geklappt hat, lässt sich im Nachhinein nicht mehr erklären. Der Trend, dass BSA in der äußeren Phase die HYP-DCHA-Stabilität erhöht, ist aber trotzdem zu erkennen. Der hohe positive Einfluss des DMEMs auf die SLN-Formulierung in Kapitel 4.3.5.2 konnte bei den NE-Formulierungen nicht gefunden werden. Im Vergleich zur Formulierung mit 1 % BSA in der äußeren Phase war die HYP-DCHA-Wiederfindung bei DMEM als äußere Phase geringer (vergleiche Tabelle 4.22).

In den Formulierungen ohne BSA in der äußeren Phase konnte nach 31 Tagen nur noch in einer der drei Formulierungen HYP-DCHA detektiert werden. Es kann festgehalten werden, dass HYP-DCHA in den NE-Formulierungen bei Anwesenheit von BSA in der äußeren Phase eine längere Stabilität aufweist (vergleiche mit Kapitel 4.3.4).

4.3.6 Passive Beladung

Wie im Methoden-Kapitel 3.2.3.3.4 auf Seite 61 beschrieben, können die lipidbasierten Nanopartikel auch ohne Wirkstoff hergestellt und anschließend beladen werden. Dadurch entfallen die HYP-DCHA-degradierenden Einflüsse während der Herstellung in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage und bei den SLN-Formulierungen zusätzlich die thermische Belastung bei der Herstellung der Voremulsion.

4.3.6.1 Vorversuche ohne Arzneistoffträgersysteme

Damit sichergestellt werden kann, dass das HYP-DCHA die Versuchsbedingungen bei der passiven Beladung ohne Degradierung übersteht, wurde die Wiederfindung von HYP-DCHA im Vorfeld ohne Arzneistoffträgersysteme getestet.

Jeweils 0,5 ml einer ethanolischen HYP-DCHA-Lösung mit 40 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA wurden in einen Rundkolben pipettiert und bei 40 °C sowie 85 mbar über 5 Minuten einrotiert ($n = 6$). Die 40 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA entsprachen der Konzentration, die auch für die passive Beladung der SLN- und NE-Formulierungen vorgelegt wurde (vergleiche Kapitel 3.2.3.3.4). In jedem der einrotierten Rundkolben wurde das HYP-DCHA mit 2 ml Ethanol für 10 Minuten unter Rotation (100 rpm) von der Kol-

benwand aufgelöst und anschließend der HYP-DCHA-Gehalt im Ethanol bestimmt. Mit einer Wiederfindung von 101,96 % ($\pm 4,59$ %) konnte das eingesetzte HYP-DCHA vollständig wiedergefunden werden. Die kurze thermische Belastung von 40 °C und das Auskristallisieren wirkten sich nicht auf die HYP-DCHA-Stabilität aus (vergleiche auch Kapitel 4.1).

4.3.6.2 Beladungskinetik

Wie der Tabelle 4.23 zu entnehmen ist, hat die Beladungszeit der Arzneistoffträgersysteme einen Einfluss auf die Wiederfindung des HYP-DCHA. Die Beladungszeit ist jene Zeit, in der das einrotierte HYP-DCHA von der Kolbenwand in die Lipidphase der Formulierung diffundieren konnte. Die Drehzahl des Kolbens betrug während der Beladung 100 rpm.

Beladungszeit in min	HYP-DCHA-Wiederfindung in %			
	SLN	Rückstand	NE	Rückstand
2,5	16,59	39,80	39,19	9,37
5,0	16,08	35,15	47,62	3,98
7,5	36,04	18,72	90,60	2,99
10,0	36,02 \pm 2,55	7,90 \pm 7,84	94,72 \pm 5,03	0,25 \pm 0,76
20,0	45,94	< LOD	N/A	N/A

Tabelle 4.23: HYP-DCHA-Wiederfindung nach passiver Beladung mit unterschiedlichen Beladungszeiten. Die Spalte *Rückstand* entspricht der wiedergefundenen HYP-DCHA-Menge im Rundkolben nach der passiven Beladung der Formulierung (n = 1, SLN bei Beladungszeit 10 min n = 6, NE bei Beladungszeit 10 min n = 8, N/A: nicht vorhanden).

Bei den SLN-Formulierungen stieg die HYP-DCHA-Wiederfindung von 17 % bei 2,5 Minuten auf 46 % nach einer Beladungszeit von 20 Minuten an. Gleichzeitig sank der Anteil des HYP-DCHA-Rückstands im Kolben von 40 % bis zur Nachweisgrenze von unter 1,7 % (<LOD). Die Addition des wiedergefundenen Anteils in den Formulierungen zusammen mit den Rückständen in den Kolben ergibt einen arithmetischen

Mittelwert von $50 \pm 5\%$. Demnach konnte bei den SLN-Formulierungen nur die Hälfte des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden werden.

Auch bei den NE-Formulierungen hat die Beladungszeit einen Einfluss auf die Wiederfindung des HYP-DCHA. Hier wurden nach 10 Minuten 95 % des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden. Im Kolben konnten zu diesem Zeitpunkt noch 0,25 % des eingesetzten HYP-DCHA detektiert werden. Die Wiederfindung nach 20 Minuten wurde aus diesem Grund nicht weiter untersucht.

Wird der zum jeweiligen Zeitpunkt wiedergefundene HYP-DCHA-Anteil durch die vergangene Zeitspanne dividiert, lässt sich die Beladungsgeschwindigkeit bestimmen. In den SLN-Formulierungen nimmt die Beladungsgeschwindigkeit von 7 % pro min bei 2,5 Minuten auf 2 % pro min bei 20 Minuten Beladungszeit ab. Die Beladungsgeschwindigkeit der NE-Formulierungen sinkt von 15 % pro min bei 2,5 Minuten auf 10 % pro min bei einer Beladungszeit von 10 Minuten.

Diskussion

Die passive Beladungsmethode erreicht bei den SLN-Formulierungen erstmals Wiederfindungen von deutlich über 10 %. Dies lässt sich durch die geringeren thermischen Einflüsse während der Präparation und in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage erklären. Die Standardabweichungen für den Rückstand der SLN-Formulierungen schwanken stärker als die Standardabweichungen für den wiedergefundenen Anteil in den Formulierungen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass das HYP-DCHA im Kolben weiteren Einflüssen unterliegt. Da die Wiederfindung mit längerer Beladung kontinuierlich ansteigt, ist es möglich, dass eine Beladungszeit > 20 Minuten in einer Wiederfindung > 46 % resultieren könnte. Dass die Überprüfung dieser Hypothese nicht relevant ist, wird im nächsten Kapitel 4.3.6.3 deutlich.

Das HYP-DCHA in den NE-Formulierungen profitiert ebenfalls von der passiven Beladungsmethode. Bei der direkten Beladung wurden Wiederfindungen von knapp 50 % erreicht, zumindest ohne Einsatz von BSA in der äußeren Phase, während durch die passive Beladung Wiederfindungen von annähernd 100 % möglich waren. Eine Beladungskinetik kann auf Grundlage der geringen Datenlage nicht berechnet werden, aber es war zu beobachten, dass mit zunehmender Zeit die Beladungsgeschwindigkeit

sinkt und gegen einen Grenzwert läuft.

Eine Abnahme der Beladungsgeschwindigkeit war zu erwarten, da durch Auflösvorgänge die Oberfläche der HYP-DCHA-Kristalle an der Kolbenwand kontinuierlich sinkt, was nach der Noyes-Whitney-Gleichung 2.4.4 (Seite 38) direkt proportional zur Abnahme der Lösungsgeschwindigkeit ist. Grundsätzlich sollte auch die Sättigungskonzentration des HYP-DCHA und das Vorhandensein von Sink-Bedingungen berücksichtigt werden, da beides ebenfalls Auswirkungen auf die Beladungsgeschwindigkeit hat. Aufgrund der geringen HYP-DCHA-Konzentrationen von 10 µmol/l wurden diese beiden Einflussfaktoren allerdings nicht weiter berücksichtigt.

Bei den Vorversuchen in Kapitel 4.3.6.1 wurde das eingesetzte HYP-DCHA vollständig wiedergefunden. In Anwesenheit der SLN- oder NE-Formulierung scheint die Wiederfindung erschwert zu sein. Es kam zu einer Diskrepanz von etwa 50 % zwischen dem eingesetzten HYP-DCHA und dem Anteil, der als Summe aus dem in der Formulierung wiedergefundenem Anteil und dem Rückstand im Kolben ermittelt wurde. Bei den NE-Formulierungen wird diese Diskrepanz mit Zunahme der Beladungszeit geringer, bei den SLN-Formulierungen bleibt sie bestehen. Da die Degradierung des HYP-DCHA während der einzelnen Prozessschritte der HPLC-Analytik ausgeschlossen werden kann, müssen die Verluste während der Beladung selbst stattfinden.

4.3.6.3 Lagerstabilität

Die passive Beladung konnte die Wiederfindung von HYP-DCHA steigern bzw. ermöglichte diese in den SLN-Formulierungen überhaupt erst. Auf die Langzeitstabilität hatte sie allerdings keinen Einfluss, wie Tabelle 4.24 zeigt. Die HYP-DCHA-Wiederfindung in den SLN-Formulierungen lag nach fünf Tagen unterhalb der Nachweisgrenze (<LOD).

In den NE-Formulierungen sank die Wiederfindung an HYP-DCHA in den ersten fünf Tagen um ca. 1,2 % pro Tag, nach elf Tagen um etwa 3 % pro Tag.

Lagerzeit in Tagen	HYP-DCHA-Wiederfindung \pm SD in %	
	SLN passiv	NE passiv
0	31,36 \pm 9,39	91,40 \pm 2,20
5	<LOD	85,21 \pm 4,01
8	<LOD	67,56 \pm 2,63
11	<LOD	57,99 \pm 4,59

Tabelle 4.24: HYP-DCHA-Wiederfindung von passiv beladenen SLN- und NE-Formulierungen mit jeweils 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA und einer Beladungszeit von 10 Minuten, gelagert bei 8 °C (n = 5).

Diskussion

Durch die passive Beladung wurde eine hohe HYP-DCHA-Wiederfindung in den lipidbasierten Nanopartikeln erreicht. Die SLN-Formulierungen zeigen aber weiterhin die in Kapitel 4.3.3.4 diskutierten Instabilitäten des HYP-DCHA.

In den direkt beladenen NE-Formulierungen (Kapitel 4.3.4) sank die HYP-DCHA-Wiederfindung mit ca. 1 % pro Tag konstanter und geringer als in den passiv beladenen Formulierungen. Die passive Beladung führte allerdings zu höheren Wiederfindungen direkt nach der Beladung. Der Zusatz von BSA in der äußeren Phase erhöhte hingegen die HYP-DCHA-Stabilität über die Zeit (vergleiche Kapitel 4.3.5.3). Ob sich dies auch positiv auf die passiv beladenen Systeme auswirkt, wird im nächsten Kapitel 4.3.6.4 untersucht. Die Stabilität des HYP-DCHA in den NE-Formulierungen scheint konzentrationsabhängig zu sein und sinkt bei hohen HYP-DCHA-Konzentration schneller als bei niedrigen Konzentration.

Die passive Beladungsmethode erhöht die HYP-DCHA-Wiederfindung direkt nach der Beladung, aber sowohl die SLN- als auch die NE-Formulierungen können das HYP-DCHA nicht über mehrere Tage stabilisieren.

4.3.6.4 Beladungskinetik mit BSA

Die stabilisierende Wirkung von Bovinem Serumalbumin (BSA) auf das HYP-DCHA wurde für die direkte Beladung der SLN- und NE-Formulierungen in Kapitel 4.3.5

untersucht. Hier waren die Wiederfindungen von HYP-DCHA schon mit 1 % BSA in der äußeren Phase deutlich erhöht. Da sich in Kapitel 4.3.6.2 die passive Beladungsmethode im Vergleich zur direkten auf die HYP-DCHA-Wiederfindung als vorteilhafter herausgestellt hat, sollen in diesem Kapitel beide Methoden vereint werden.

Beladungszeit in min	HYP-DCHA-Wiederfindung in %			
	SLN	Rückstand	NE	Rückstand
2,5	61,62	<LOD	77,37	<LOD
5,0	69,70	<LOD	91,76	<LOD
7,5	58,77	<LOD	55,18	<LOD
10,0	72,07 ± 5,03	<LOD	100,78 ± 4,96	<LOD
20,0	77,73 ± 0,43	<LOD	100,27 ± 3,94	<LOD

Tabelle 4.25: HYP-DCHA-Wiederfindung nach passiver Beladung mit unterschiedlichen Beladungszeiten. Die Spalte *Rückstand* entspricht der wiedergefundenen HYP-DCHA-Menge im Rundkolben nach der passiven Beladung der Formulierung (n = 1, bei Beladungszeiten 10 und 20 min n = 3).

Die Tabelle 4.25 beschreibt die HYP-DCHA-Wiederfindungen in den SLN- und NE-Formulierungen mit jeweils 1 % BSA in den äußeren Phasen nach unterschiedlichen Beladungszeiten. Es zeigte sich, dass in den SLN-Formulierungen schon nach einer Beladungszeit von 2,5 Minuten die HYP-DCHA-Wiederfindung um 34 % höher war als nach der 20 minütigen Beladungszeit ohne BSA in der äußeren Phase (vergleiche Kapitel 4.3.6.2). Die Beladungsgeschwindigkeit nimmt von anfänglich 25 % min⁻¹ nach 2,5 Minuten auf 4 % min⁻¹ nach einer Beladungszeit von 20 Minuten ab.

Verglichen dazu ist die HYP-DCHA-Wiederfindung in den NE-Formulierungen nach einer Beladungszeit von 2,5 Minuten fast doppelt so hoch wie im vorherigen Kapitel 4.3.6.2 ohne BSA in der äußeren Phase. Nach einer Beladungszeit von 10 Minuten wird das eingesetzte HYP-DCHA vollständig wiedergefunden. Die Beladungsgeschwindigkeit sinkt von 31 % min⁻¹ bei einer Beladungszeit von 2,5 Minuten auf 10 % min⁻¹ nach einer Beladungszeit von 10 Minuten. In beiden Formulierungen wurde zu keiner Beladungszeit HYP-DCHA im Kolben detektiert.

Diskussion

Durch die geringe Versuchsanzahl der ersten drei Beladungszeiten von $n = 1$ sind die Wiederfindungen des HYP-DCHA nicht sehr aussagekräftig. Nach einer Beladungszeit von 7,5 Minuten liegen in beiden Formulierungen die Wiederfindungen sogar unterhalb derjenigen nach den Beladungszeiten von 2,5 oder 5 Minuten. Wahrscheinlich ist diese unerwartet niedrige HYP-DCHA-Wiederfindung auf einen zufälligen Fehler zurückzuführen.

Die Wiederfindung von HYP-DCHA in den SLN-Formulierungen lag nach einer Beladungszeit von 10 Minuten bei über 70 %. Nach einer Beladungszeit von 20 Minuten konnte die Wiederfindung noch einmal um fast 8 % gesteigert werden. Dies sind, im Vergleich zu allen vorherigen Versuchen, die höchsten Wiederfindungen, die in den SLN-Formulierungen bestimmt werden konnten. Die Beladungsgeschwindigkeit lag bei einer Beladungszeit von 20 Minuten bei $4 \% \text{ min}^{-1}$. Damit war es unwahrscheinlich, dass allein durch die Erhöhung der Beladungszeit das restliche, eingesetzte HYP-DCHA nachgewiesen werden konnte. Im Kolbenrückstand wurde kein HYP-DCHA detektiert. Damit gingen ca. 20 % des eingesetzten HYP-DCHA während des Beladungsprozesses verloren. Der Versuch, die HYP-DCHA-Wiederfindung durch eine längere Beladungszeit zu erhöhen oder den Verbleib des verloren gegangenen HYP-DCHA-Anteils aufzuklären, wurde nicht unternommen, da dies, wie im nächsten Kapitel 4.3.6.5 zu sehen ist, nicht zielführend gewesen wäre.

Bei den NE-Formulierungen zeigte sich, dass die Beladung nach ≤ 10 Minuten abgeschlossen war und näherungsweise 100 % des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden wurden. Die Anwesenheit von 1 % BSA in der äußeren Phase hatte bei kurzen Beladungszeiten von unter 7,5 Minuten einen positiven Einfluss auf die HYP-DCHA-Wiederfindung. Bei einer Beladungszeit von 10 Minuten relativierte sich der positive Einfluss des BSA in der äußeren Phase (vergleiche Kapitel 4.3.6.2). Dementsprechend scheint BSA nicht nur die HYP-DCHA-Stabilität zu fördern, sondern fungiert zusätzlich auch als Lösungsvermittler. Dies legt den Schluss nahe, dass es zwischen dem BSA und HYP-DCHA-Molekül zu einer Proteinbindung kommt [138].

4.3.6.5 Lagerstabilität mit BSA

Die Kombination der passiven Beladungsmethode mit 1 % BSA-Zusatz in der äußeren Phase der SLN- und NE-Formulierungen hat zu einer hohen HYP-DCHA-Wiederfindung geführt. Die Tabelle 4.26 zeigt die HYP-DCHA-Wiederfindung dieser Formulierungen über 60 Tage.

Das HYP-DCHA in den SLN-Formulierungen konnte über einen Zeitraum von elf Tagen nachgewiesen werden, wohingegen bei den Formulierungen ohne BSA in der äußeren Phase nach fünf Tagen kein HYP-DCHA mehr detektiert werden konnte (vergleiche Kapitel 4.3.6.3). In der NE-Formulierungen gab es innerhalb der ersten elf Tage kaum Veränderungen in der HYP-DCHA-Wiederfindung. Nach 60 Tagen konnte noch über 80 % des eingesetzten HYP-DCHA wiedergefunden werden.

Lagerzeit in Tagen	HYP-DCHA-Wiederfindung \pm SD in %	
	SLN passiv	NE passiv
0	74,33 \pm 4,72	100,58 \pm 4,03
5	21,54 \pm 3,15	101,86 \pm 4,68
8	8,55 \pm 2,14	97,02 \pm 1,23
11	3,94 \pm 0,99	97,83 \pm 1,06
20	N/A	91,43 \pm 2,01
34	N/A	82,93 \pm 2,44
60	N/A	80,21 \pm 1,78

Tabelle 4.26: HYP-DCHA-Wiederfindung von passiv beladenen SLN- und NE-Formulierungen mit jeweils 10 μ mol/l HYP-DCHA und 1 % BSA in der äußeren Phase. Beladungszeit 10 Minuten, gelagert bei 8 °C (n = 5, N/A: nicht vorhanden).

Diskussion

In den SLN-Formulierungen ist das HYP-DCHA auch mit der passiven Beladungsmethode und dem Zusatz von 1 % BSA in der äußeren Phase nicht stabilisierbar. Ein Grund dafür ist wahrscheinlich der feste Aggregatzustand des Lipids, wodurch sich

das HYP-DCHA zum größten Teil nur an die Oberfläche der SLN anlagern kann und dort nicht ausreichend vor degradierenden Einflüssen geschützt ist.

In den Nanoemulsionen wird durch die Kombination aus passiver Beladungsmethode und 1 % BSA in der äußeren Phase die Stabilität des HYP-DCHA für mindestens elf Tage gewährleistet. Darüber hinaus lässt sich allerdings eine Degradation des HYP-DCHA feststellen. Bei einem linearen Fit der HYP-DCHA-Wiederfindungen über die untersuchten 60 Tage ergibt sich eine Steigung bzw. eine Verringerung der Wiederfindung von $-0,39\%$ HYP-DCHA pro Tag.

Damit ist es mit der NE-Formulierung gelungen das empfindliche HYP-DCHA für knapp zwei Wochen zu stabilisieren und eine Formulierung zu entwickeln, in der das HYP-DCHA in nanopartikulärer Verteilung vorliegt und somit für verschiedenste Szenarien applizierbar wird (vergleiche Theorie-Kapitel 2.2).

4.4 Auswirkungen der HYP-DCHA-Formulierungen auf die in-vitro 2D-Kultivierung von Keratinozyten-Zellen

Ein Großteil der Zellkulturexperimente wurde in Kooperation mit Füller et al. durchgeführt. In den gemeinsam veröffentlichten Ergebnissen [39] wurde die Stabilität von HYP-DCHA unter standardisierten Zellkulturbedingungen sowie der Einfluss von beladenen ANP auf die Viabilität und die Zelltoxizität von in-vitro HaCaT Monolayern, einer immortalisierten menschlichen Keratinozyten-Zelllinie, untersucht (siehe Methodenkapitel 3.2.5). Noch unveröffentlicht sind die Ergebnisse von MTT-Tests mit HaCaT-Zellen für die lipidhaltigen Formulierungen, wobei ein Teil der SLN-Daten und die Untersuchungen der Auswirkung von NE auf die HaCaT-Zellen unabhängig von Füller et al. entstanden sind.

4.4.1 HYP-DCHA-Stabilität unter Zellkulturbedingungen und Einfluss auf HaCaT-Zellen

Die Untersuchungen mit gelöstem HYP-DCHA zeigten, dass die Stabilität von reinem HYP-DCHA unter Zellkulturbedingungen eher begrenzt ist. Erst durch die Zugabe von mindestens 5 % FCS waren die 10 µmol/l HYP-DCHA in den Zellkulturmedien über 24 Stunden stabil. Die Wiederfindung wurde mit der HPLC-Analytik quantifiziert [39]. Das im FCS enthaltene BSA stabilisiert das HYP-DCHA konzentrationsabhängig. Dieser stabilisierende Effekt wurde bereits bei den ANP beobachtet, die aus BSA bestehen (siehe Kapitel 4.2.2.3).

Ein Einfluss von HYP-DCHA auf HaCaT-Zellen wurde über eine Verringerung der Zell-Viabilität erfasst. In einem Medium mit 10 % FCS konnte bis zu einer HYP-DCHA-Konzentration von 1 µmol/l keine Abnahme der Zell-Viabilität beobachtet werden. Höhere HYP-DCHA-Konzentrationen von 5 bis 10 µmol/l zeigten einen dosisabhängigen Rückgang der relativen Viabilitäten von HaCaT-Zellen auf bis zu 65 %. Diese Werte korrelieren mit Literaturdaten [139]. Weder der durchgeführte

CellToxTM Green Assay noch die Lebend-Totzellfärbung zeigten eine Zytotoxizität bei den untersuchten HYP-DCHA-Konzentrationen.

Im Gegensatz dazu hatten bei der serumfreien Kultivierung der HaCaT-Zellen, also ohne den Zusatz von FCS, schon HYP-DCHA-Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ einen Einfluss auf die Zell-Viabilität. Bei HYP-DCHA-Konzentrationen von 5 bis 10 $\mu\text{mol/l}$ lag die Zell-Viabilität bei nahezu null Prozent. Hier zeigte sich in der Lebend-Totzellfärbung, dass nahezu alle Zellen abgestorben waren, was auf eine erhöhte Zytotoxizität schließen lässt. Die erhöhte Zytotoxizität konnte durch den CellToxTM Green Assay bestätigt werden [39].

Diskussion

In Abwesenheit von FCS wurde eine stark erhöhte Zytotoxizität gegenüber HaCaT-Zellen beobachtet, die wahrscheinlich auf die Instabilität des HYP-DCHA in Form von Fällungs- und Oxidationsreaktionen [28] zurückzuführen ist. In Gegenwart von FCS wird HYP-DCHA sowohl solubilisiert als auch stabilisiert. Das bedeutet, dass auch bei höheren HYP-DCHA-Konzentrationen keine Fällungen oder Oxidationen auftreten und somit keine Zytotoxizität beobachtet wird. Dementsprechend sollten für In-vitro-Versuche immer serumhaltige Systeme verwendet werden, auch wenn das relativ stabile HYP-DCHA-Salz eingesetzt wird.

Außerdem ist allgemein anerkannt, dass Albumin viele Schutzfunktionen in der Zellkultivierung übernimmt [140]. Damit könnte das FCS nicht nur das HYP-DCHA stabilisieren, sondern auch die Zellen vor einer zytotoxischen HYP-DCHA-Wirkung schützen. Da bei Anwesenheit von FCS erst HYP-DCHA-Konzentrationen von 1 $\mu\text{mol/l}$ eine Zytotoxizität auf HaCaT-Zellen zeigen, wird als Nächstes untersucht, ob sich diese Beobachtung auch mit den aus BSA bestehenden und mit HYP-DCHA beladenen ANP reproduzieren lässt.

4.4.2 Hydrophile Protein-Nanopartikel

Die in Kooperation mit Füller erhobenen Ergebnisse für die beladenen ANP sind in Tabelle 4.27 dargestellt (siehe Abbildungsteil 7C in [39]). Die Zellen zeigten eine

4.4 Auswirkungen der HYP-DCHA-Formulierungen auf die in-vitro 2D-Kultivierung von Keratinozyten-Zellen

dosisabhängige Abnahme der Viabilität mit zunehmender HYP-DCHA-Konzentration (w/o ANP), was die Daten aus dem vorherigen Kapitel 4.4.1 bestätigt. Allerdings zeigen die relativen Viabilitäten zwischen den HYP-DCHA-Beladungen von 5 und 10 µmol/l keine statistische Signifikanz, trotz einer Verdopplung der HYP-DCHA-Konzentration. Bei einer Kultivierung mit beladenen ANP ist die Abnahme der Viabilität deutlich stärker. Während eine aus 0,8 mg/ml BSA hergestellte, unbeladene ANP-Formulierung keinen Einfluss auf die Viabilität der HaCaT-Zellen hatte, sank die Viabilität bei einer HYP-DCHA-Beladung von 5 µmol/l auf unter 10 %. Die gleiche HYP-DCHA-Konzentration hatte bei der ANP-freien Kultivierung eine Abnahme der Zell-Viabilität auf ca. 70 % zur Folge. Alle Untersuchungen in diesem Kapitel wurden in DMEM mit 10 % FCS durchgeführt.

HYP-DCHA-Konzentration/ Beladung in µmol/l	relative Viabilität ± SD in %	
	w/o ANP	beladene ANP
0	100,00 ± 15,48	100,00 ± 22,90
1	90,97 ± 09,68	66,13 ± 32,26
5	69,68 ± 07,58	9,68 ± 09,52
10	63,55 ± 10,00	6,13 ± 06,45

Tabelle 4.27: MTT-Viabilitäts-Tests der HaCaT-Monolayer nach 24 Stunden Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS (Mediumskontrolle wurde auf 100 % Viabilität gesetzt, w/o ANP: n = 12, beladene ANP: n = 13, jeweils aus drei unabhängigen Experimenten).

Diskussion

Unter standardisierten Zellkulturbedingungen ist entweder der Zusatz von FCS- oder von Albumin-Nanopartikeln notwendig, um das HYP-DCHA ausreichend zu stabilisieren (vergleiche Lagerstabilitätskapitel 4.2.2.4). Von Füller darüber hinausgehend durchgeführten Lebend-Totzellfärbungen und Zytotoxizitätstests haben gezeigt, das freies BSA aus dem FCS die Zytotoxizität von HYP-DCHA gegenüber HaCaT-Zellen hemmt (vergleiche Kapitel 4.4.1), während dies bei ANP nicht beobachtet werden konnte [39]. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust der Viabilität von HaCaT-Zellen

bei der Behandlung mit HYP-DCHA-beladenen ANP eher auf zytotoxische als auf antiproliferative Effekte zurückzuführen ist. Unbeladene ANP zeigen keine Zytotoxizität und haben dementsprechend keinen Einfluss auf die Zell-Viabilität (siehe HYP-DCHA-Beladung mit 0 $\mu\text{mol/l}$ in Tabelle 4.27).

Die erhöhte Zytotoxizität der beladenen ANP ließe sich durch eine verbesserte Aufnahme des HYP-DCHA in die Zellen erklären. HYP-DCHA, welches im Zellinneren freigesetzt wird, würde dort wahrscheinlich ein deutlich höheres Toxizitätspotential aufweisen als extrazelluläres HYP-DCHA. Die Zellaufnahme von Wirkstoffen aus Nanopartikeln erfolgt oft über die rezeptorvermittelte Endozytose [84, 141]. Dafür interagieren die Protein-Nanopartikel mit Rezeptoren, die auf der Zellmembran vorhanden sind. Das et al. konnten zeigen, dass diese Interaktion Abhängig von der Partikelgröße ist. Die höchste Wirkstoffaufnahme für die dort untersuchten Humanalbumin (HSA)-Nanopartikel an einer A549 Zelllinie² lag bei einer HSA-Partikelgröße von etwa 125 nm [142].

Des Weiteren ist auch denkbar, dass die ANP von den Zellen aufgenommen werden. Für HaCaT-Zellen ist bekannt, dass diese Nanopartikel in der Größenordnung der ANP aufnehmen können. Dies ist für Siliziumdioxid- (\varnothing 50 nm) und Titandioxid-Nanopartikel (\varnothing 125 nm) beschrieben [143, 144]. Dass Nanopartikel allgemein durch unterschiedliche Mechanismen von Zellen aufgenommen werden können, ist ebenfalls gut untersucht [145].

4.4.3 Lipidbasierte Nanopartikel

4.4.3.1 SLN-Formulierungen

Vor der Kultivierung von HaCaT-Zellen mit beladenen lipidbasierten Nanopartikeln wurden die Auswirkungen der unbeladenen Systeme auf die HaCaT-Zellen untersucht. Bei den SLN-Formulierungen hat sich gezeigt, dass die Zell-Viabilität bei unverdünnten Formulierungen sehr stark abnahm und auf $0,53 \pm 0,96 \%$ sank. Erst ab einer Verdünnung von 1:100 lag die Zell-Viabilität nach 24 Stunden bei über 90 %

² Zellen aus dem Adenokarzinom der Lunge eines 58-jährigen weißen Amerikaners

4.4 Auswirkungen der HYP-DCHA-Formulierungen auf die in-vitro 2D-Kultivierung von Keratinozyten-Zellen

($91,11 \pm 11,60$ %, jeweils $n = 6$ aus zwei unabhängigen Versuchen, Verdünnungsmedium DMEM).

Daraufhin wurde die äußere Phase der SLN-Formulierung untersucht, welche aus einer wässrigen DMEM-Phase besteht, die mit 1 % des Emulgators Solutol HS 15 versetzt ist. Bei der Untersuchung der unverdünnten äußeren Phase wurde eine Zell-Viabilität von $6,13 \pm 3,99$ % gemessen, bei einer 1:10 Verdünnung lag die Viabilität bei $9,72 \pm 5,42$ % und bei einer 1:100 Verdünnung wurde eine Zell-Viabilität von $101,84 \pm 8,74$ % erreicht (jeweils $n = 6$ aus zwei unabhängigen Versuchen).

Es ist davon auszugehen, dass das Tensid Solutol für die geringe Zell-Viabilität verantwortlich ist. Aus diesem Grund wurden die SLN-Formulierungen für die weiteren Untersuchungen immer 1:100 verdünnt. Die HYP-DCHA-Beladungskonzentration wurde dementsprechend erhöht, damit nach der Verdünnung die benötigte HYP-DCHA-Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$ in den verdünnten Formulierungen vorlag.

HYP-DCHA-Konzentration/ Beladung in $\mu\text{mol/l}$	relative Viabilität \pm SD in %	
	w/o SLN	beladene SLN
0	$100,00 \pm 11,53$	$61,43 \pm 17,25$
1	$31,54 \pm 10,95$	$65,05 \pm 16,90$

Tabelle 4.28: MTT-Viabilitäts-Tests der HaCaT-Monolayer nach 24 Stunden

Kultivierung in DMEM ohne FCS ($n = 6$, Mediumskontrolle wurde auf 100 % Viabilität gesetzt).

Wie Tabelle 4.28 (linke Spalte w/o SLN) zeigt, erniedrigt eine HYP-DCHA-Lösung von $1 \mu\text{mol/l}$ unter FCS-freien Bedingungen (serumfrei) die Viabilität von HaCaT-Zellen auf 31,54 %. Wie weiter oben beschrieben (siehe Kapitel 4.4.1), wird vermutet, dass aufgrund des fehlenden FCS das reine HYP-DCHA instabil ist und deshalb degradiert. Die entstehenden Zersetzungsprodukte schädigen die HaCaT-Zellen. In Gegenwart von SLN, die HYP-DCHA stabilisieren könnten, sollte daher eine geringere Schädigung der HaCaT-Zellen zu erwarten sein.

Die Zell-Viabilitäten aus Tabelle 4.28 (rechte Spalte beladene SLN) bestätigen diese Erwartung. Die relative Viabilität bei den mit $1 \mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA beladenen SLN

liegt mit 65,05 % in der gleichen Größenordnung wie die der unbeladenen SLN und in etwa doppelt so hoch wie die Kontrollproben ohne SLN (31,54 %). Außerdem weichen diese Viabilitäten der beladenen SLN (65,05 %) nicht signifikant von den beladenen ANP aus Tabelle 4.27 (66,13 %, Kapitel 4.4.2) ab. Demnach sind keine zytotoxischen HYP-DCHA-Zersetzungsprodukte entstanden, welche die HaCaT-Zellen zusätzlich hätten schädigen können. Allerdings ist festzuhalten, dass die Zell-Viabilität der 1:100 verdünnten unbeladenen SLN mit 61,43 % unter den weiter oben gefundenen 90 % Zell-Viabilität lag.

Diskussion

Die festgestellte Korrelation zwischen Emulgator und der Zell-Viabilität scheint nicht überraschend, da alle verbleibenden Komponenten wie Triglyceride und Lecithin physiologisch verträglich sind. Es ist bekannt, dass ein Teil des Solutol HS 15, welches für die Stabilität der SLN benötigt wird, mit der Zeit aus der SLN-Oberfläche in das umgebende wässrige Medium austritt [146]. Dadurch kann es direkt mit den HaCaT-Zellen interagieren.

In einer Studie von Maupas et al. wurden unterschiedliche Emulgatoren auf die konzentrationsabhängige Beeinflussung der Viabilität von HaCaT-Zellen untersucht [147]. Es wurde beschrieben, dass schon eine Solutol HS 15 Konzentration von 0,01 % Auswirkung auf die Zell-Viabilität hat. Dies entspricht der hier verwendeten Solutol HS 15 Konzentration, die aus der SLN Verdünnung von 1:100 resultiert. Maupas et al. zeigten weiterhin, dass HaCaT-Zellen die Emulgatoren Cremophor EL (PEG-35 Rizinusöl) und Simulsol 4000 (PEG-40 hydriertes Rizinusöl) in Konzentrationen um ca. eine halbe Zehnerpotenz höher tolerieren. Demzufolge müssten die SLN-Formulierungen immer noch 1:50 verdünnt werden. Die Beeinflussung der Zell-Viabilität durch unbeladene SLN-Formulierungen lässt sich somit zusammenfassend durch die Emulgatorkonzentration abschätzen.

4.4.3.2 NE-Formulierungen

Ähnlich verhält sich die Zell-Viabilität bei den Formulierungen mit den NE. Der direkte Vergleich dieser Formulierungen mit den SLN-Formulierungen ist in Abbildung 4.16 dargestellt.

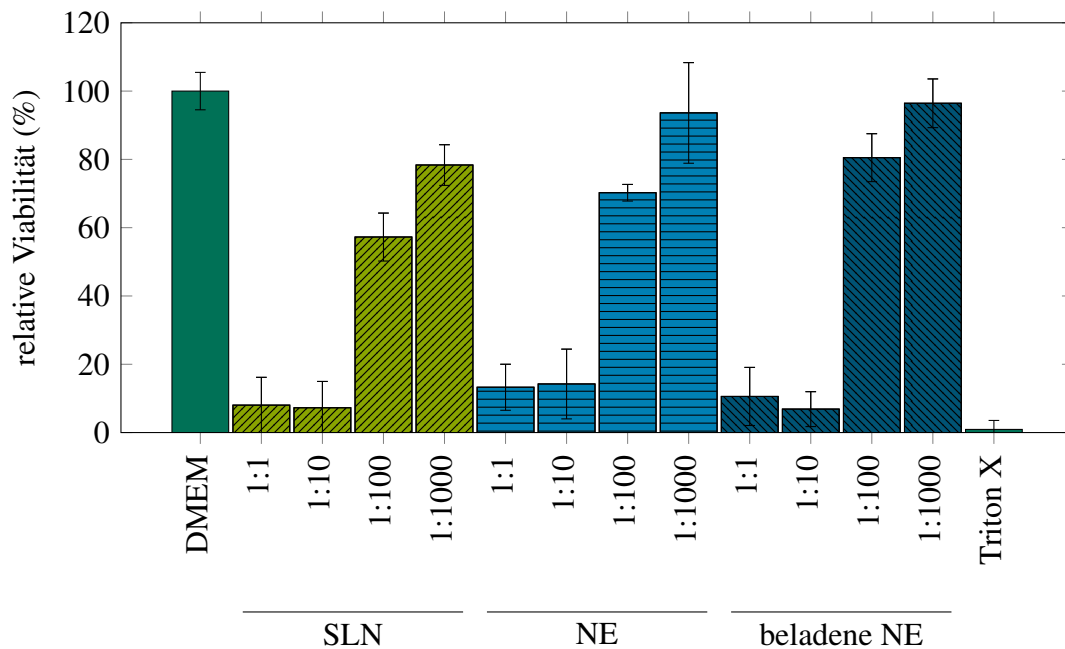


Abbildung 4.16: MTT-Viabilitäts-Tests der HaCaT-Monolayer nach 24 Stunden Kultivierung mit DMEM ohne FCS (Mediumkontrolle auf 100 % Viabilität gesetzt, Balken entsprechen $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$). Die Beladung der beladenen NE entspricht 100 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA mit $n = 9$.

Auch bei den NE-Formulierungen kommt es aufgrund des Solutol HS 15 in der äußeren Phase zu einer Absenkung der Zell-Viabilität, die ab einer Verdünnung von 1:100 bei $70,23 \pm 2,43$ % liegt. Dies entspricht in der Größenordnung der Zell-Viabilität von 1:100-verdünnten SLN-Formulierungen. Auffällig ist, dass die Viabilitäten der HaCaT-Zellen in dieser Versuchsreihe geringer als üblich ausfielen (vergleiche zum Beispiel Tabelle 4.28). Allerdings ist auch die Zahl der Wiederholungen mit $n = 3$ relativ klein.

Interessant ist der Vergleich mit den beladenen NE. Die mit 100 $\mu\text{mol/l}$ HYP-

DCHA beladenen NE-Formulierungen entsprechen bei einer 1:100 Verdünnung einer HYP-DCHA-Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ ($n = 9$). Die Zell-Viabilität lag hier bei $80,50 \pm 7,02 \%$ und damit nicht unterhalb der Zell-Viabilität der unbeladenen NE-Formulierungen. Dies spricht für eine ausreichende Stabilisierung des HYP-DCHA durch die NE.

Folgend wurde untersucht, ob sich die Instabilität des HYP-DCHA in den NE-Formulierungen (vergleiche die vorangegangenen Kapitel ab Kapitel 4.3.4) auch in einer Beeinflussung der Zell-Viabilität nachweisen lässt. Die Tabelle 4.29 zeigt dafür die Zell-Viabilitäten von unterschiedlichen NE-Formulierungen über einen Zeitraum von 13 Wochen. Die im Verhältnis 1:100 verdünnten NE-Formulierungen mit unterschiedlichen äußeren Phasen hatten eine HYP-DCHA-Beladung von 0,1 bzw. 1 $\mu\text{mol/l}$.

Zeit in Wochen	relative Viabilität \pm SD in %			
	HYP-DCHA-Konzentration: 0,1 $\mu\text{mol/l}$			1 $\mu\text{mol/l}$
	w/o BSA	1 % BSA	DMEM	DMEM
0	$84,55 \pm 7,77$	$85,53 \pm 1,95$	$73,03 \pm 8,29$	$80,5 \pm 5,12$
4	$78,3 \pm 10,16$	$80,06 \pm 7,4$	$88,55 \pm 2,21$	$65,65 \pm 13,45$
7	$72,11 \pm 9,75$	$74,08 \pm 4,53$	$60,66 \pm 8,16$	$55,93 \pm 9,95$
13	$68,98 \pm 18,44$	$64,22 \pm 6,47$	$57,11 \pm 1,12$	$66,87 \pm 3,64$

Tabelle 4.29: MTT-Viabilitäts-Tests der HaCaT-Monolayer nach 24 Stunden

Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS (0,1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA: $n = 3$, 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA: $n = 9$, Mediumkontrolle auf 100 % Viabilität gesetzt).

Über den Zeitraum von 13 Wochen sank die Zell-Viabilität bei den Formulierungen ohne BSA um 1,21 % pro Tag, mit 1 % BSA um 1,66 % pro Tag und mit DMEM um 1,72 % pro Tag. Die DMEM-Formulierungen mit 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA-Beladung zeigten eine Viabilitätserniedrigung von 1,00 % pro Tag.

Allgemein nahm damit die Zell-Viabilität über die Zeit bei allen Formulierungen ab. Einzelne vermeintliche Ausreißer sind bei den 4 Wochen alten Formulierungen mit einer HYP-DCHA-Beladung von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ und bei den 13 Wochen alten Formulierungen mit 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA festzustellen.

Diskussion

Wird der vermeintliche Ausreißer bei den 13 Wochen alten Formulierungen mit 1 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA nicht berücksichtigt, dann war die Abnahme der Zell-Viabilität mit 3,52 % pro Tag bei diesen Formulierungen am größten. Dies würde sich mit der erhöhten Abbaurate von höher beladenen NE-Formulierungen aus vorangegangenen Experimenten decken, da eine geringere HYP-DCHA-Stabilität mehr zytotoxische Reaktionen hervorbringt.

Voraussetzung für eine solche Aussage ist, dass die Abnahme der Zell-Viabilitäten in direktem Zusammenhang mit der Degradierung und damit der Wiederfindung des HYP-DCHA in den Formulierungen steht. Unter dieser Annahme ist die Zersetzung des HYP-DCHA in den hier gezeigten Experimenten gegenüber den Versuchen aus Kapitel 4.3.4 um ca. ein halbes Prozent pro Tag erhöht.

Anders als die Ergebnisse aus Tabelle 4.22 in Kapitel 4.3.5.3 haben die unterschiedlichen äußeren Phasen der HYP-DCHA-Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ jedoch keinen großen Einfluss auf die Zell-Viabilität. Zur Erinnerung: Die einzelnen NE-Formulierungen waren mit 10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA beladen und wurden bei 8 °C gelagert. Für die Viabilitäts-Tests wurden die Formulierungen im Verhältnis 1:100 mit DMEM verdünnt.

Dies lässt darauf schließen, dass die Zell-Viabilität nicht in direkte Korrelation mit der Degradation und damit der Bildung von zytotoxischen Abbauprodukten des HYP-DCHA gesetzt werden kann. Weitere Einflussfaktoren wie die zytotoxische Wirkung der Formulierungsbestandteile, der Nanopartikel und die Auswirkung des HYP-DCHA auf die HaCaT-Zellen beeinflussen die Zell-Viabilität ebenfalls.

5 Abschlussdiskussion

In der Abschlussdiskussion sollen noch einmal Aspekte berücksichtigt werden, die im Ergebnisteil bisher nicht diskutiert wurden.

5.1 Hydrophile Proteinnanopartikel

Die Polymernanopartikel aus Bovinem Serumalbumin (BSA) waren unter kontrollierten Bedingungen in einer engen und über mehrere Wochen stabilen Partikelgrößenverteilung von ca. 100 nm herstellbar. Die Dauer der Quervernetzung, der Beladungszeitpunkt und die Beladungskonzentration mit HYP-DCHA hatten keinen nachweisbaren Einfluss auf die Partikelgröße. Durch eine Erhöhung der ANP-Anzahl in der Formulierung wird deren Agglomeration begünstigt, was durch einen Anstieg der Partikelgröße bestätigt wurde.

5.1.1 Partikelgrößenbestimmung

Dieser Anstieg kann aber auch noch andere Ursachen haben. So kann ein Überschreiten der zulässigen Messkonzentration das Ergebnis der dynamischen Lichtstreuung (DLS) beeinflussen. Dies ist darin begründet, dass bei der DLS-Messung die Bewegung der Teilchen gemessen wird, weshalb diese sich in einem ausreichend hohen, räumlichen Abstand zueinander befinden müssen, damit es zu keinen Störungen untereinander kommt (siehe Kapitel 3.2.4.4.1). Da alle Proben für diese Partikelgrößenbestimmung äquivalent vermessen wurden, könnte die Teilchenbewegung bei den hohen ANP-Konzentrationen eingeschränkt sein, wodurch fälschlicherweise zu große Partikelgrößen bestimmt wurden.

Das im Messgerät eingebaute Dämpfungsglied und die nichtinvasive Rückstreuung verringern zwar eine Mehrfachstreuung an den Partikeln, allerdings nicht die gegenseitige Hinderung der Bewegung in der äußeren Phase. Die Dämpfung wird automatisch in elf Stufen unterteilt, wobei Stufe 11 keine Abschwächung des Lasers bedeutet. Bei den BSA-Konzentrationen von 0,2 bis 3,2 mg/ml lag die Dämpfung bei der niedrigsten Konzentration von 0,2 mg/ml bei 6. Alle anderen Konzentrationen hatten eine konstante Dämpfung von 4. Bei den BSA-Konzentrationen von 0,8 mg/ml wurden auch Vergleichsmessungen mit der Laserdiffraktometrie durchgeführt. Diese konnten die DLS-Messungen bezüglich der Partikelgröße bestätigen, weshalb die zulässige Messkonzentration hier noch nicht überschritten war. Nichtsdestotrotz sollte der Effekt von falschen Partikelgrößen bei zu hohen Partikelkonzentrationen berücksichtigt werden und die Proben sollten vor der Messung entsprechend verdünnt werden [148].

Für eine differenziertere Untersuchung der Aggregationszahlen der ANP kann für zukünftige Versuche zusätzlich die statische Lichtstreuung verwendet werden. Diese eignet sich auch für die Bestimmung von Molmassen und des Gyrationsradius R_g , der für die Charakterisierung der räumlichen Ausdehnung unregelmäßig geformter Partikel verwendet wird. Gemeinsam mit dem hydrodynamischen Durchmesser R_h aus der dynamischen Lichtstreuung wäre es somit möglich, ein besseres Bild der Partikelform zu erhalten.

5.1.2 HYP-DCHA-Wiederfindung

Kongruent zur Partikelgrößenbestimmung gibt es auch für die HYP-DCHA-Wiederfindung noch zusätzliche Punkte zu beachten. Besonders fehleranfällig sind beispielsweise Messungen mit sehr geringen HYP-DCHA-Konzentrationen im Bereich von 0,3 $\mu\text{mol/l}$. Hier kam es zu auffällig hohen Standardabweichungen und besonders niedrigen HYP-DCHA-Wiederfindungen, die schon ausführlich in Kapitel 4.2.2.2 (ab Seite 112) diskutiert wurden. Ein Aspekt, der dabei allerdings bisher unberücksichtigt blieb, ist die bereits 1956 von Bull beschriebene Adsorption von Albumin an Glas [149]. Dieser Effekt wurde ausführlich von Rager untersucht und liegt bei maximal 9 mg/m² Glasoberfläche [150]. Wird berücksichtigt, dass die ANP-Herstellung in zwei Becher-

gläsern durchgeführt wurde, der Austausch der äußeren Phase in einem Rundkolben und die Lagerung in einem verbördelten Vial stattfand, dann ergibt sich eine Gesamt-Glasoberfläche¹ von insgesamt 0,0315 m². Dies entspricht einer BSA-Adsorption von etwa 0,3 % des für die Formulierung verwendeten BSA. Sollten dagegen auch die ANP an den Glaswänden adsorbieren können, dann könnte sich dieser Effekt auch auf die HYP-DCHA-Wiederfindung auswirken, da nur wenige der BSA-Monomere aus den ANP mit der Glaswand interagieren müssten, um verhältnismäßig viele ANP zurückzuhalten. Dies würde bei der HYP-DCHA-Gehaltsbestimmung in einer zu geringen Wiederfindung resultieren. Für eine Beurteilung dieses Effekts müsste deshalb bei zukünftigen Versuchen der Gehalt an adsorbierten ANP bestimmt werden. Dies könnte durch ein Anfärben der ANP mit Coomassieblau geschehen. Die angefärbten Partikel könnten anschließend mit einer Ammoniaklösung abgelöst und danach UV/VIS-spektroskopisch untersucht werden [150].

Allgemein konnte gezeigt werden, dass ANP mit einer BSA-Konzentration von 0,8 mg/ml eine HYP-DCHA-Beladung von 10 µmol/l über einen Zeitraum von 2 Wochen zu über 77 % stabilisieren (siehe Kapitel 4.2.2.4). Niedrigere HYP-DCHA-Beladungen von 1 µmol/l konnten zu über 90 % stabilisiert werden. Dabei korrelierte die BSA-Konzentration der ANP mit der HYP-DCHA-Wiederfindung. Das bedeutete auch, dass mit zunehmender HYP-DCHA-Beladung die Lagerstabilität des HYP-DCHA sank. Durch eine Erhöhung der ANP-Konzentration konnte die HYP-DCHA-Wiederfindung dementsprechend gesteigert werden. Dies führte allerdings zu einer höheren Wahrscheinlichkeit der Partikelagglomeration (vergleiche Kapitel 4.2.1.5).

5.1.3 Einsatz als Darreichungsform

Fraglich ist, ob die ANP-Beladungen von 10 µmol/l beispielsweise für die Therapie von Depressionen ausreichend ist. Hier wird bisher ein hyperforinhaltiger Johanniskraut-Trockenextrakt verwendet. Die oral benötigte Dosis an Hyperforin beträgt 14,8 mg (vergleiche Theoriekapitel 2.1 auf Seite 23). Bei einer HYP-DCHA-Beladung von 10 µmol/l entspricht dies einem Volumen von etwa 2,8 Liter der ANP-Formulier-

¹ $O_{\text{Becherglas}} = 0,51 \text{ dm}^2$, $O_{\text{Rundkolben}} = 1,66 \text{ dm}^2$, $O_{\text{Vial}} = 0,48 \text{ dm}^2$

ung². Sofern die ANP nicht die Aufnahme des HYP-DCHA deutlich verbessern, wodurch eine geringere HYP-DCHA-Konzentration benötigt wird, rücken aktuell eher Anwendungen im kutanen Bereich in den Vordergrund. Hier wurde in klinischen Studien belegt, dass bereits eine Creme mit einer Hyperforin-Konzentration von 1,5 % (als Johanniskrautextrakt) eine positive Wirkung bei Neurodermitis-Erkrankungen aufweist [151]. Da durch die Nanopartikel die Hautpenetration verbessert wird, sind mit ANP auch noch geringere Konzentrationen für eine positive Wirkung aussichtsreich (vergleiche Kapitel 2.2).

Sollte die ANP-Formulierung intravenös appliziert werden, so müssten noch weitere Punkte beachtet werden. Beispielsweise bildet sich um die Nanopartikel bei einer systemischen Anwendung innerhalb von Sekunden eine Proteincorona aus. Da im Blut vor allem Albumin und Fibrinogen in großen Mengen vorliegen, werden diese auch den größten Anteil der angelagerten Proteine an der Nanopartikeloberfläche ausmachen [152, 153]. Deshalb könnte die Proteincorona eine zusätzliche Stabilisierung des HYP-DCHA begünstigen. Andererseits wird es durch die Anlagerung wahrscheinlich auch zu einer Steigerung der Partikelgröße kommen. Ein Effekt, der bereits bei der Zugabe von FCS, welches zum größten Teil aus Albumin besteht, beobachtet wurde (siehe Kapitel 4.2.1.6). Die BSA-Konzentrationen für die ANP-Formulierungen lagen meist bei 0,4 %. Die Konzentration an Albumin im menschlichen Blut liegt hingegen bei 3,5 bis 5,3 %, weshalb neben der Ausbildung einer Proteincorona auch noch eine mögliche Agglomeration der ANP zu berücksichtigen ist. Der Einsatz der ANP als Arzneistoffträgersysteme für HYP-DCHA ist im aktuellen Entwicklungsstadium limitiert und am ehesten für eine kutane Applikation geeignet. Da die Beladungszeitpunkte keinen signifikanten Einfluss auf die HYP-DCHA-Wiederfindung aufwiesen, sind alle hier hergestellten ANP mit einer BSA-Konzentration von 0,8 mg/ml und einer HYP-DCHA-Beladung von bis zu 5 µmol/l gleichermaßen geeignet.

² $\beta_H = c_H \cdot M_H = 10 \mu\text{mol/l} \cdot 536,79 \mu\text{g}/\mu\text{mol} \cdot \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{mol}} = 5,37 \text{ mg/l}$

$V_A = \frac{m_{H-Dosis}}{\beta_H} = \frac{14,8 \text{ mg}}{5,37 \text{ mg/l}} = 2,76 \text{ l}$

H: HYP-DCHA, A: ANP-Formulierung

5.2 Lipidhaltige Nanopartikel

Die Suspensionen aus festen Lipidnanopartikeln (solid lipid nanoparticles, SLN) und Nanoemulsionen (NE) waren mit den ermittelten Prozessparametern aus der statistischen Versuchsplanung reproduzierbar, in einer mittleren Partikelgröße von 100 nm herstellbar und für mehrere Monate stabil.

5.2.1 SLN-Formulierungen

Die SLN-Formulierungen wurden mit der Schmelz-Homogenisation produziert und mussten dafür auf 70 °C erwärmt werden. Diese erhöhte Temperatur führte innerhalb von wenigen Minuten zu einer Degradierung des in den Formulierungen enthaltenen HYP-DCHA (siehe Kapitel 4.3.3.3). Bisher unberücksichtigt blieb dabei die chemische Stabilität des amphoteren Tensids Lecithin (Phospholipon® 90 G).

Dieses wird nicht nur für die Voremulsion erwärmt, sondern durchläuft ebenfalls die Mikrokanalhochdruckemulgieranlage, wobei es hohen Temperaturen und Drücken ausgesetzt ist. Außerdem liegt das Tensid während der Herstellung in einem flüssigen Zustand vor, der im Vergleich zu seinem festen Zustand weitere chemische Zersetzungen ermöglicht. Im Arzneibuchkommentar wird für dieses Lecitin ein ungesättigter Fettsäureanteil von 62 bis 66 % Linolsäure, 8 bis 12 % Ölsäure und 6 bis 8 % Linolensäure angegeben. Dabei handelt es sich um oxidationsempfindliche Fettsäuren, die bei der Autoxidation Peroxylradikale ausbilden [101, 154]. Diese hochreaktiven Radikale könnten eine Erklärung dafür sein, weshalb es in den erwärmten SLN-Voremulsionen zu einer erhöhten Oxidation des HYP-DCHA kam, wohingegen eine ethanolische HYP-DCHA-Lösung bei erhöhten Temperaturen zu keiner HYP-DCHA-Degradation führte. Der Zusatz eines Antioxidationsmittels wie α -Tocopherol, das auch mehrstündige Temperaturen von über 100 °C übersteht, könnte diese thermische Autoxidation verhindern [155, 156]. Alternativ könnte ein hydriertes Lecithin wie Phospholipon® 90 H für die Lipidmatrix verwendet werden.

Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die auskristallisierenden Lipide (Softisan® HS154) den Wirkstoff an die Grenzfläche drücken, wo er Licht und Sauerstoff

ausgesetzt ist. Mit der Bildung der festen Triglyceridphase ist die Kristallisation aber noch nicht abgeschlossen, da sich zuerst eine instabile α -Modifikation aus runden Partikeln ausbildet. Danach folgt entweder direkt die stabile β -Modifikation oder vorher noch die metastabile β' -Modifikation. Dabei verliert die disperse Phase ihre runde Morphologie und bildet anisometrische, plättchenförmige Partikel aus. Die Umwandlung erfolgt immer in Richtung der höher schmelzenden β -Modifikation. Die thermodynamisch günstigste β -Form weist hierbei die geordnetste Kristallstruktur auf, wodurch noch mehr Wirkstoff an die Grenzfläche gedrückt wird [157–159]. Um die vorteilhafte α -Modifikation zu erhalten, kann die Phasenumwandlung unter anderem durch Fettsäuren, bestimmte Emulgatoren, modifiziertes Phospholipid in Kombination mit Natriumglycocholat oder durch ein schnelles Abkühlen der Formulierung von Prozess- auf Raumtemperatur verzögert werden [159, 160].

Aus diesen Gründen eignen sich die verwendeten SLN nur bedingt als Arzneistoff-trägersysteme für das HYP-DCHA, da sie dieses in den hier verwendeten Formulierungen nicht ausreichend stabilisieren.

5.2.2 NE-Formulierungen

Das Lipid der Nanoemulsion ist bei Raumtemperatur flüssig, weshalb zur Herstellung die Kalt-Homogenisation verwendet wird. Das gelöste HYP-DCHA befindet sich größtenteils innerhalb der Lipidtröpfchen und nicht in der Grenzfläche, wodurch es im Vergleich zu den SLN-Formulierungen länger stabil ist. Allerdings wird bei der aktiven Beladungsmethode ebenfalls ein Teil des HYP-DCHA durch den Herstellungsprozess in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage degradiert. Der Zusatz von BSA kann dies partiell verhindern und verlangsamt auch den Abbau des HYP-DCHA über die Zeit. Jedoch war es erst durch die Verwendung der passiven Beladungsmethode und der zusätzlichen Zugaben von gelöstem Albumin in die NE-Formulierungen möglich, eine vollständige Stabilisierung des HYP-DCHA über einen Zeitraum von 2 Wochen zu erreichen. Wahrscheinlich sind bei höheren BSA-Konzentrationen de facto noch größere Zeiträume möglich (vergleiche Kapitel 4.3.5.3).

Unberücksichtigt blieb bisher die übergeordnete Struktur des BSA. Da das BSA

immer vor der Herstellung der lipidhaltigen Nanopartikel zur wässrigen Phase hinzugefügt wurde, lag es nach der Homogenisierung in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage wahrscheinlich denaturiert vor. Trotzdem stabilisiert das BSA das HYP-DCHA, da die Faltung bei diesem kleinen Polypeptid keinen großen Einfluss auf die Bindungsaffinität zum HYP-DCHA besitzt [161, 162]. Dies liegt auch daran, dass das Molekül in der denaturierten Form hydrophober ist, was die Anlagerung an die lipophilen Grenzflächen der Nanopartikel begünstigt und damit die Wechselwirkungen mit dem Hyperforin-Molekül erleichtert [163]. Diese Eigenschaft fördert allerdings auch die Adsorption an Glasoberflächen, wodurch das BSA während der Herstellung zum Teil verloren geht (siehe Kapitel 5.1.1).

Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Wiederholung der SDS-Page mit BSA und HYP-DCHA (vergleiche Kapitel 4.2.1.1), da sich bei einem BSA-HYP-DCHA-Komplex die Laufweite zu reinem BSA unterscheidet. Fraglich ist dementsprechend auch, ob sich die stabilisierende Wirkung von BSA durch eine nachträgliche Zugabe zu den lipidhaltigen Formulierungen, in seiner aktiven Form, weiter verbessern ließe.

Im Gegenzug ist auch der umgekehrte Effekt denkbar. Durch seine Bindungsaffinität zum HYP-DCHA könnte das BSA dieses aus der Lipidphase in die äußere Phase ziehen, womit es Licht und Sauerstoff ausgesetzt ist. Deshalb wäre es interessant zu untersuchen, ob nachträglich zugesetztes BSA ab einer bestimmten Konzentration zu einer verringerten HYP-DCHA-Stabilität in den lipophilen Arzneistoffträgern führt. Obwohl es noch zahlreiche offene Fragen und Verbesserungsmöglichkeiten gibt, ist es mit den NE gelungen, eine kolloidale HYP-DCHA-Formulierung zu entwickeln, in der das empfindliche HYP-DCHA über 2 Wochen stabil ist.

5.3 Zellkultur

Für eine mögliche kutane Applikation der HYP-DCHA-Formulierungen wurden diese in-vitro an Keratinozyten-(HaCaT)-Zellen getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Albuminlösung sowohl das HYP-DCHA stabilisiert als auch die Zellen vor potentiell zytotoxischen Effekten des HYP-DCHA schützt. Im Vergleich dazu

erhöht sich die Zytotoxizität, wenn das HYP-DCHA in Form von beladenen Albumin-Nanopartikeln vorliegt. Dies könnte als Anhaltspunkt dafür gewertet werden, dass die Albumin-Nanopartikel die Zellbarriere überwinden können bzw. die Aufnahme des Wirkstoffs verbessern, wodurch das HYP-DCHA in höheren Konzentrationen in das Zellinnere gelangt. Damit eignen sich ANP gut für eine kutane Applikation. Dass Nanopartikel allgemein durch unterschiedliche Mechanismen von Zellen aufgenommen werden können, ist für viele Systeme gut untersucht [145]. So erfolgt beispielsweise die Aufnahme des Zytostatikums Paclitaxel in Kombination mit ANP durch eine Transcytose, wodurch der Wirkstoff in die Tumorzwischenräume gelangt und dort spezifisch wirken kann [164].

Außerdem schützen die lipidhaltigen Nanopartikel (SLN und NE) die Zellen vor zytotoxischen HYP-DCHA-Abbauprodukten. Da hier allerdings nur Viabilitätstest mit einer MTT-Lösung durchgeführt wurden, kann die Zytotoxizität nicht abschließend beurteilt werden. Dafür hätten weitere Tests wie der CellTox[™] Green Cytotoxicity Assay durchgeführt werden müssen[39].

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die notwendige 1:100 Verdünnung der lipidhaltigen Formulierungen. Diese war aufgrund des zytotoxischen Emulgators Solutol[®] HS15 in der äußeren Phase der Formulierungen erforderlich. Um diesen Verdünnungsschritt im Bezug auf die HYP-DCHA-Beladungskonzentration auszugleichen, wurde die HYP-DCHA-Beladung um den Faktor 100 erhöht. Es ist fraglich, ob das HYP-DCHA in diesen hohen Konzentrationen in den lipidhaltigen Formulierungen ausreichend stabil ist. Außerdem kann durch die 1:100 Verdünnung der Einfluss der lipidhaltigen Nanopartikel auf die Wirkstoffaufnahme nicht beurteilt werden. Folglich kann nur den ANP-Formulierungen eine mögliche kutane Anwendung bescheinigt werden.

5.4 Fazit und Ausblick

Es hat sich für das HYP-DCHA herausgestellt, dass die Nanoemulsionen nach einer passiven Beladung mit dem Wirkstoff und in Gegenwart eines BSA-Zusatzes von 1 % die vielversprechendsten Arzneistoffträgersysteme sind.

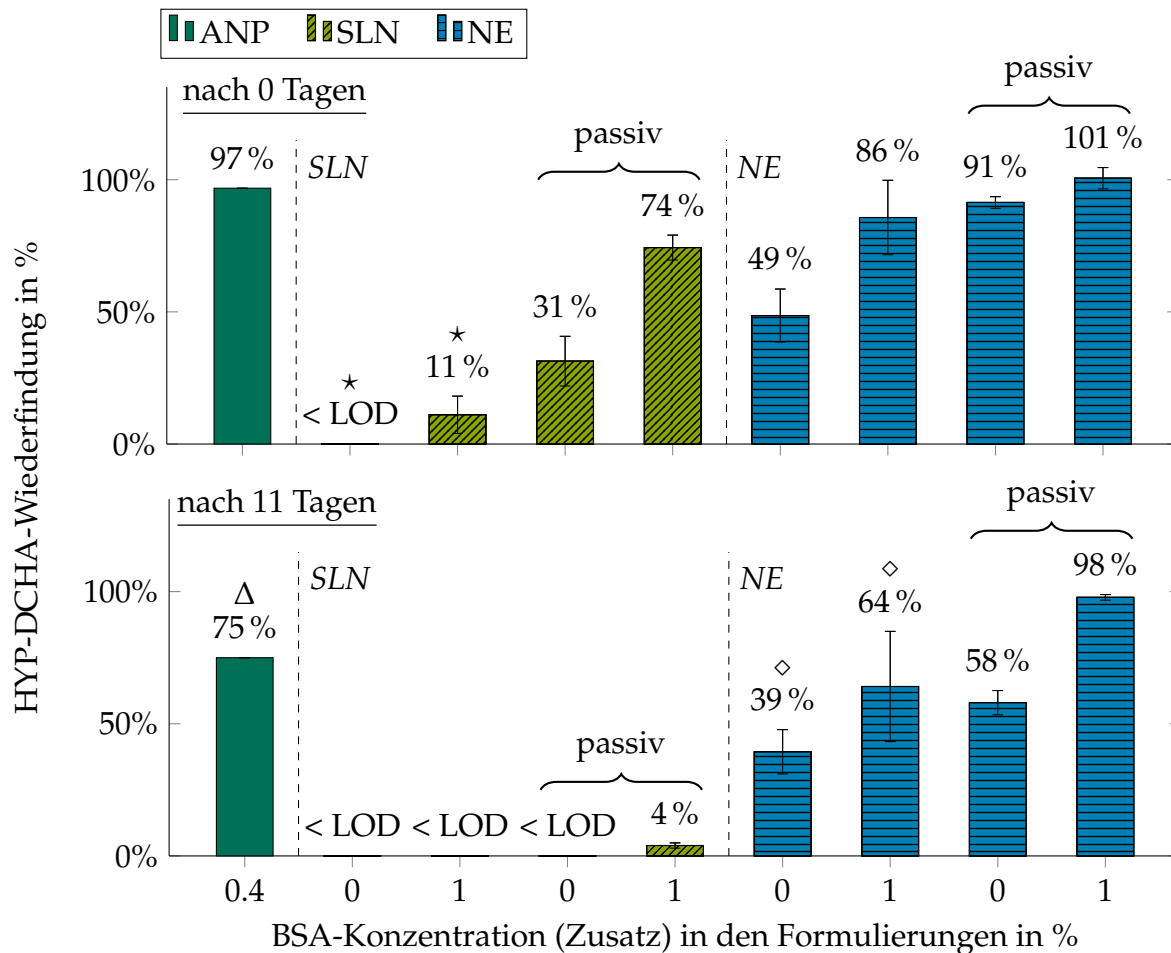


Abbildung 5.1: Zusammenfassung der HYP-DCHA-Wiederfindung beladener Formulierungen (10 $\mu\text{mol/l}$ HYP-DCHA) nach einer Lagerzeit von 0 und 11 Tagen, Lagertemperatur: 8 °C, BSA-Konzentration der ANP: 0,8 mg/ml, Beladungszeitpunkt ANP: HnQ, passiv = passive Beladungsmethode (NE- und SLN-Formulierungen), < LOD = unterhalb der Nachweisgrenze, Kennzeichnung abweichender Lagerzeiten: ★ = 1 Tag, Δ = 15 Tage, ◇ = 24 Tage.

Dies wird auch in der Übersichtsabbildung 5.1 deutlich. Das obere Diagramm zeigt die HYP-DCHA-Wiederfindung direkt nach der Herstellung, während das untere Diagramm die HYP-DCHA-Wiederfindung in den untersuchten Formulierungen nach ca. zwei Wochen darstellt.

Für zukünftige Arbeiten sind die HYP-DCHA-Abbauprodukte in den Formulierungen zu identifizieren, unter anderem mit der Massenspektroskopie. Gegebenenfalls könnten geeignete Gegenmaßnahmen ergriffen werden, um die HYP-DCHA-Stabilität in den Trägersystemen weiter zu erhöhen. Ein möglicher Ansatzpunkt zur weiteren Stabilisierung des HYP-DCHA ist die Kombination aller drei Arzneistoffträgersysteme. Da die Aufnahmekapazität von festen Lipid-Nanopartikeln begrenzt ist und die Nanoemulsionen eine hohe Mobilität der inkorporierten Wirkstoffmoleküle aufweisen, ist eventuell ein Gemisch aus festen und flüssigen Lipiden zielführend. Dabei werden die flüssigen Bestandteile mit einer hohen Wirkstoffaufnahmekapazität in die feste Lipidmatrix eingebettet und stören dort die geordnete Domäne der Lipidkristalle, wodurch höhere Beladungskapazitäten möglich sind. Diese Lipidsysteme sind als nanostrukturierte Lipidträger (nanostructured lipid carriers, NLC) bekannt [165, 166]. Wenn die NLC zusätzlich mit BSA und Antioxidantien versetzt werden, könnte sich ein für das Hyperforin-Molekül sehr stabiles Arzneistoffträgersystem ergeben. Im Vergleich zu einer Nanoemulsion wäre das HYP-DCHA in diesem System durch die Einbettung in die feste Lipidmatrix deutlich besser vor äußeren Einflüssen geschützt.

Neben der Weiterentwicklung der hier vorgestellten Formulierungen können die Erfahrungen dieser Arbeit auch genutzt werden, um andere potentielle Systeme zu optimieren. So scheint gerade der HYP-DCHA-Einschluss in Cyclodextrin-Komplexen vielversprechend zu sein, da in diesen unstabilisiertes Hyperforin in einem 1,8-Methyl- β -Cyclodextrin-Komplex bereits über 6 Monate zu 97,5 % stabilisiert werden konnte [167, 168].

Diese Arbeit hat somit einen wichtigen Grundlagenbeitrag zur HYP-DCHA-Stabilisierung geleistet und neue Entwicklungsmöglichkeiten im Bereich der Arzneistoffträgersysteme aufgezeigt.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, für das schwer wasserlösliche und chemisch instabile Hyperforin-Molekül eine geeignete kolloidale Formulierung auf der Basis von unterschiedlichen Arzneistoffträgersystemen zu entwickeln. Dafür wurde das seit Anfang der 2000er Jahre bekannte und vergleichsweise stabile Dicyclohexylammoniumsalz (HYP-DCHA) verwendet. Als Voraussetzung für die Einarbeitung von HYP-DCHA in kolloidale Arzneistoffträgersysteme konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine ethanolische HYP-DCHA-Lösung bei 8 °C für mindestens 6 Wochen und bei 60 °C für mindestens 4 Stunden stabil ist.

Das erste untersuchte Arzneistoffträgersystem waren Polymernanopartikel aus Bovinem Serumalbumin (BSA), da diese aufgrund ihrer breiten Anwendung ein gut erprobtes und einfach herzustellendes System darstellen. Die Herstellung erfolgte durch Desolvatation und die anschließende Stabilisierung durch thermische Quervernetzung. Die daraus resultierenden Albumin-Nanopartikel (ANP) waren unter kontrollierten Bedingungen in einer engen und über mindestens 3 Wochen stabilen Partikelgrößenverteilung produzierbar. Das Z-Mittel lag bei ca. 100 nm. Die Dauer der Quervernetzung, der Beladungszeitpunkt und die Beladungskonzentration mit HYP-DCHA hatten keinen nachweisbaren Einfluss auf die Partikelgröße. Eine Erhöhung der ANP-Anzahl begünstigt deren Agglomeration, sodass ein Anstieg der Partikelgröße beobachtet wurde. Bei der Beladung der ANP mit 10 µmol/l HYP-DCHA wurden 97 % davon wiedergefunden. Über einen Zeitraum von 2 Wochen konnten die ANP 92 % des HYP-DCHA einer 1 µmol/l HYP-DCHA-Beladung stabilisieren. Die Beladungszeitpunkte zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die HYP-DCHA-Wiederfindung. Der Gehalt an ANP korrelierte mit der HYP-DCHA-Wiederfindung.

Als lipidhaltige Arzneistoffträgersysteme wurden Suspensionen aus festen Lipidna-

nopartikeln (solid lipid nanoparticles, SLN) und Nanoemulsionen (NE) untersucht. Die Herstellung der Nanopartikel erfolgte in einer Mikrokanalhochdruckemulgieranlage. Die verwendeten Prozessparameter wurden mit einer statistischen Versuchsplanung (Design of Experiments, DoE) in einem Central Composite Inscribed (CCI) Modell optimiert. Damit ließen sich die Parameter für eine mittlere Partikelgröße von ca. 120 nm berechnen und reproduzierbar herstellen. Bei einer Lagertemperatur von 8 °C blieben die SLN für mindestens 3 Monate und die NE für über 11 Monate in ihrer Partikel- bzw. Tröpfchengröße stabil.

Für die Herstellung der SLN-Formulierungen in der Mikrokanalhochdruckemulgieranlage müssen diese auf 70 °C erwärmt werden. Diese erhöhte Temperatur führte innerhalb von wenigen Minuten zu einer Degradierung des in den Formulierungen enthaltenen HYP-DCHA. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Bildung von Peroxylradikalen bei der Autoxidation der ungesättigten Fettsäuren des Lecitins. Des Weiteren wird vermutet, dass die auskristallisierenden Lipide den Wirkstoff an die Grenzfläche drücken, wo er der Exposition von Licht und Sauerstoff ausgesetzt ist. Aus diesen Gründen eignen sich SLN nur bedingt als Arzneistoffträgersystem für das HYP-DCHA.

Das Lipid der Nanoemulsionen ist bei Raumtemperatur flüssig, weshalb zur Herstellung die Kalt-Homogenisation verwendet wurde. Außerdem befindet sich das gelöste HYP-DCHA in den Lipid-Tröpfchen, wodurch es in diesen Formulierungen im Vergleich zu den SLN-Formulierungen länger stabil ist. Es hat sich gezeigt, dass auch gelöstes, natives Bovines Serumalbumin eine für das HYP-DCHA stabilisierende Eigenschaft besitzt. Durch die Zugabe einer Albuminlösung zu den NE-Formulierungen war es möglich, das HYP-DCHA über einen Zeitraum von 31 Tagen zu stabilisieren. Eine Beladung mit nahezu 100 % des eingesetzten HYP-DCHA konnte aber erst durch eine passive Beladungsmethode erreicht werden. Damit ist es gelungen, eine kolloidale HYP-DCHA-Formulierung zu entwickeln, in der das empfindliche HYP-DCHA für über 2 Wochen stabil ist.

Für eine mögliche kutane Applikation der HYP-DCHA-Formulierungen wurden diese abschließend in einer in-vitro 2D-Kultivierung von Keratinozyten-(HaCaT)-Zellen untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass eine Albuminlösung sowohl das

HYP-DCHA stabilisiert als auch die Zellen vor einer potentiell zytotoxischen Wirkung von gelöstem HYP-DCHA schützt. Im Vergleich dazu erhöht sich die Zytotoxizität, wenn das HYP-DCHA in Form von beladenen Albumin-Nanopartikeln inkubiert wurde. Dies lässt vermuten, dass Albumin-Nanopartikel die Wirkstoffaufnahme in die Zellen verbessert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nanoemulsionen nach einer passiven Beladung und einem BSA-Zusatz von 1 % die vielversprechendsten Arzneistoffträgersysteme für das HYP-DCHA darstellen. Somit konnte diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung des schwer wasserlöslichen Hyperforin-Moleküls in einer kolloidalen Formulierung leisten.

7 Summary

The aim of this work was to develop a suitable colloidal formulation for the poorly water soluble and chemically unstable hyperforin molecule on the basis of different drug delivery systems. For this purpose, the comparatively stable dicyclohexylammonium salt (HYP-DCHA) known from the 2000s years is used. As a prerequisite for working with HYP-DCHA in colloidal drug delivery systems, it could be shown in this work that an ethanolic solution from the HYP-DCHA is stable for at least 6 weeks with 8 °C and for at least 4 hours with 60 °C.

The first drug delivery system to be investigated were polymer nanoparticles of bovine serum albumin (BSA), since their broad application makes them a well-proven and easy-to-produce system. They were produced by desolvation and then stabilized by thermal crosslinking. The resulting albumin nanoparticles (ANP) could be produced under controlled conditions in a narrow and stable particle size distribution for at least 3 weeks. The z-average was approximately 100 nm. The duration of the crosslinking, the loading time and the loading concentration with HYP-DCHA had no detectable influence on the particle size. An increase in the ANP number favored their agglomeration, which resulted in an increase in particle size. By loading the ANP with 10 µmol/l HYP-DCHA 97 % of it could be found again. Over a period of two weeks, the ANP stabilized 92 % of the HYP-DCHA (loaded with 1 µmol/l HYP-DCHA). The loading times showed no significant influence on HYP-DCHA recovery. The concentration of ANP correlated with HYP-DCHA recovery.

Suspensions of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanoemulsions (NE) were investigated as lipid-containing drug delivery systems. The nanoparticles were produced in a customized microchannel high pressure homogenization device. The used process parameters were optimized with a statistical Design of Experiments (DoE) in a Central

Composite Inscribed (CCI) model. Thus, the parameters for an average particle size of approximately 120 nm can be calculated and reproducibly produced. At a storage temperature of 8 °C the SLN were stable for at least 3 months and the NE for over 11 months in their particle and droplet size, respectively.

The SLN formulations must be heated to 70 °C before they could be homogenized in the microchannel high pressure homogenization device. The elevated temperature led to a degradation of the HYP-DCHA contained in the formulations within a few minutes. One possible explanation for this is the formation of peroxy radicals during autoxidation of the unsaturated fatty acids of lecithin. Furthermore, it is assumed that the crystallizing lipids push the active ingredient to the interface where it is exposed to light and oxygen. For these reasons, SLN are only conditionally suitable as a drug delivery system for HYP-DCHA.

The lipid of the nanoemulsions is liquid at room temperature, which is why cold homogenization was used to produce them. In addition, the dissolved HYP-DCHA is present in the lipid droplets, which makes it more stable in these formulations than in SLN formulations. It has also been shown that dissolved native bovine serum albumin has a stabilizing property for HYP-DCHA. By adding an albumin solution to the NE formulations, it was possible to stabilize the HYP-DCHA over a period of 31 days. A loading with almost 100 % of the used HYP-DCHA could only be achieved by a passive loading method. Thus, it has been possible to develop a colloidal HYP-DCHA formulation, in which the sensitive HYP-DCHA is stable for over 2 weeks.

For a potential cutaneous application of the HYP-DCHA formulations, these were finally examined in an *in vitro* 2D cultivation of keratinocyte (HaCaT) cells. It was found that an albumin solution both stabilizes the HYP-DCHA and protects the cells from the cytotoxic effect of dissolved HYP-DCHA. In comparison, cytotoxicity increased when HYP-DCHA was incubated in the form of loaded albumin nanoparticles. This suggests that albumin nanoparticles improve drug uptake into cells.

In summary, after a passive loading and a BSA addition of 1 %, nanoemulsions are the most promising drug delivery systems for HYP-DCHA. Thus, this work could make an important contribution to the stabilization of the poorly soluble hyperforin molecule in a colloidal formulation.

Literatur

- [1] P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham und N. E. Fusenig. „Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line“. In: *The Journal of Cell Biology* 106.3 (1988), S. 761–771. DOI: 10.1083/jcb.106.3.761 (siehe S. 12, 45).
- [2] „Confirmed Minutes for the Meeting in Uppsala“. In: Committee and Subcommittee on Nomenclature, Properties and Units. Uppsala: IUPAC, 2008 (siehe S. 13).
- [3] A. Akinc, M. A. Maier, M. Manoharan, K. Fitzgerald, M. Jayaraman, S. Barros, S. Ansell, X. Du, M. J. Hope, T. D. Madden, B. L. Mui, S. C. Semple, Y. K. Tam, M. Ciufolini, D. Witzigmann, J. A. Kulkarni, R. van der Meel und P. R. Cullis. „The Onpattro Story and the Clinical Translation of Nanomedicines Containing Nucleic Acid-Based Drugs“. In: *Nature Nanotechnology* 14.12 (2019), S. 1084–1087. DOI: 10.1038/s41565-019-0591-y (siehe S. 22).
- [4] K. C. Fischer. „Herstellung, in vitro und in vivo Charakterisierung oberflächenmodifizierter Nanopartikel auf der Basis geeigneter Trägersysteme“. Dissertation. Berlin: Freie Universität Berlin, 2007 (siehe S. 22).
- [5] P. D. Leeson. „Molecular Inflation, Attrition and the Rule of Five“. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. Understanding the Challenges of Beyond-Rule-of-5 Compounds 101 (2016), S. 22–33. DOI: 10.1016/j.addr.2016.01.018 (siehe S. 22, 29).
- [6] DAK. *Gesundheitsreport 2015*. 2015. URL: <https://www.dak.de/dak/bundesthemen/gesundheitsreport-2015-2109048.html> (besucht am 23. 09. 2019) (siehe S. 23).

- [7] U. Schwabe, D. Paffrath, W.-D. Ludwig und J. Klauber, Hrsg. *Arzneiverordnungs-Report 2018*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2018 (siehe S. 23).
- [8] Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). *Arzneimittel-Informationssystem (AMIS)*. 2019. URL: https://portal.dimdi.de/amis-off/servlet/FlowController/Sort#__DEFANCHOR__ (besucht am 09.10.2019) (siehe S. 24).
- [9] U. Stoll. *Das "Lorscher Arzneibuch": Text, Übersetzung und Fachglossar zu einem Kompendium des 8. Jahrhunderts*. Stuttgart: Franz Steiner Verlag, 1992 (siehe S. 24).
- [10] R. Brenner, V. Azbel, S. Madhusoodanan und M. Pawlowska. „Comparison of an Extract of Hypericum (LI 160) and Sertraline in the Treatment of Depression: A Double-Blind, Randomized Pilot Study“. In: *Clinical Therapeutics* 22.4 (2000), S. 411–419. DOI: 10.1016/S0149-2918(00)89010-4 (siehe S. 24).
- [11] M. Philipp, R. Kohnen und K. O. Hiller. „Hypericum Extract versus Imipramine or Placebo in Patients with Moderate Depression: Randomised Multicentre Study of Treatment for Eight Weeks“. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 319.7224 (1999), S. 1534–1538. DOI: 10.1136/bmj.319.7224.1534 (siehe S. 24).
- [12] N. Radulović, M. Genčić, N. Stojanović, P. Randjelović, N. Baldovini und V. Kurteva. „Prenylated β -Diketones, Two New Additions to the Family of Biologically Active Hypericum Perforatum L. (Hypericaceae) Secondary Metabolites“. In: *Food and Chemical Toxicology* 118 (2018), S. 505–513. DOI: 10.1016/j.fct.2018.05.009 (siehe S. 24).
- [13] F. Lang, A. Biber und C. Erdelmeier. „Hyperforin in Johanniskraut-Droge, -Extrakten Und -Präparaten“. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 31.5 (2002), S. 512–514. DOI: 10.1002/1615-1003(200209)31:5<512::AID-PAUZ512>3.0.CO;2-F (siehe S. 24).
- [14] A. I. Gurevich, V. N. Dobrynin, M. N. Kolosov, S. A. Popravko und I. D. Riabova. „[Antibiotic hyperforin from Hypericum perforatum L]“. In: *Antibiotiki* 16.6 (1971), S. 510–513 (siehe S. 24).

-
- [15] A. Biber, H. Fischer, A. Römer und S. S. Chatterjee. „Oral Bioavailability of Hyperforin from Hypericum Extracts in Rats and Human Volunteers“. In: *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1 (1998), S. 36–43. DOI: 10.1055/s-2007-979344 (siehe S. 24).
- [16] E. A. Apaydin, A. R. Maher, R. Shanman, M. S. Booth, J. N. V. Miles, M. E. Sorbero und S. Hempel. „A Systematic Review of St. John’s Wort for Major Depressive Disorder“. In: *Systematic Reviews* 5.1 (2016). DOI: 10.1186/s13643-016-0325-2 (siehe S. 24).
- [17] L. Beerhues. „Hyperforin“. In: *Phytochemistry* 67.20 (2006), S. 2201–2207. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.08.017 (siehe S. 25).
- [18] PubChem. *Biotechnology Information about Hyperforin*. 2019. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/114787> (besucht am 23. 09. 2019) (siehe S. 25).
- [19] I. Brondz. „Super Antibiotics, Part IV. Hyperforin, Relative and Absolute Stereochemistry Elucidated by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry with Supersonic Molecular Beams“. In: 2017. DOI: 10.4236/ijamsc.2017.53005 (siehe S. 25).
- [20] A. Bilia, S. Gallori und F. Vincieri. „St. John’s Wort and Depression: Efficacy, Safety and Tolerability-an Update“. In: *Life Sciences* 70.26 (2002), S. 3077–3096. DOI: 10.1016/S0024-3205(02)01566-7 (siehe S. 25).
- [21] T. Mennini und M. Gobbi. „The Antidepressant Mechanism of Hypericum Perforatum“. In: *Life Sciences* 75.9 (2004), S. 1021–1027. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.04.005 (siehe S. 25).
- [22] C. Schempp, K. Pelz, A. Wittmer, E. Schöpf und J. Simon. „Antibacterial Activity of Hyperforin from St John’s Wort, against Multiresistant Staphylococcus Aureus and Gram-Positive Bacteria“. In: *Lancet* 353.9170 (1999), S. 2129. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)00214-7 (siehe S. 25).

- [23] D. Albert, I. Zündorf, T. Dingermann, W. Müller, D. Steinhilber und O. Werz. „Hyperforin Is a Dual Inhibitor of Cyclooxygenase-1 and 5-Lipoxygenase“. In: *Biochemical Pharmacology* 64.12 (2002), S. 1767–1775. DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01387-4 (siehe S. 25).
- [24] C. Schempp, V. Kirkin, B. Simon-Haarhaus, A. Kersten, J. Kiss, C. Termeer, B. Gilb, T. Kaufmann, C. Borner, J. Sleeman und J. Simon. „Inhibition of Tumour Cell Growth by Hyperforin, a Novel Anticancer Drug from St. John’s Wort That Acts by Induction of Apoptosis“. In: *Oncogene* 21.8 (2002), S. 1242–1250. DOI: 10.1038/sj/onc/1205190 (siehe S. 25).
- [25] B. Martínez-Poveda, A. R. Quesada und M. Á. Medina. „Hyperforin, a Bio-Active Compound of St. John’s Wort, Is a New Inhibitor of Angiogenesis Targeting Several Key Steps of the Process“. In: *International Journal of Cancer* 117.5 (2005), S. 775–780. DOI: 10.1002/ijc.21246 (siehe S. 25).
- [26] B. Martínez-Poveda, L. Verotta, E. Bombardelli, A. Quesada und M. Medina. „Tetrahydrohyperforin and Octahydrohyperforin Are Two New Potent Inhibitors of Angiogenesis“. In: *PLoS ONE* 5.3 (2010). DOI: 10.1371/journal.pone.0009558 (siehe S. 25).
- [27] M. Majerník, R. Jendželovský, M. Babinčák, J. Košuth, J. Ševc, Z. Tonelli Gombalová, Z. Jendželovská, M. Buríková und P. Fedoročko. „Novel Insights into the Effect of Hyperforin and Photodynamic Therapy with Hypericin on Chosen Angiogenic Factors in Colorectal Micro-Tumors Created on Chorioallantoic Membrane“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20.12 (2019), S. 3004. DOI: 10.3390/ijms20123004 (siehe S. 25).
- [28] M. Gartner, T. Müller, J. C. Simon, A. Giannis und J. P. Sleeman. „Aristoforin, a Novel Stable Derivative of Hyperforin, Is a Potent Anticancer Agent“. In: *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 6.1 (2005), S. 171–177. DOI: 10.1002/cbic.200400195 (siehe S. 26, 162).
- [29] R. Hänsel und O. Sticher, Hrsg. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 9. Aufl. Springer-Lehrbuch. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2010 (siehe S. 26).

-
- [30] S. Trifunović, V. Vajs, S. Macura, N. Juranić, Z. Djarmati, R. Jankov und S. Milosavljević. „Oxidation Products of Hyperforin from *Hypericum Perforatum*“. In: *Phytochemistry* 49.5 (1998), S. 1305–1310 (siehe S. 26).
- [31] L. Verotta, G. Appendino, E. Belloro, J. Jakupovic und E. Bombardelli. „Furohyperforin, a Prenylated Phloroglucinol from St. John’s Wort (*Hypericum Perforatum*)“. In: *Journal of Natural Products* 62.5 (1999), S. 770–772. DOI: 10.1021/np980470v (siehe S. 26).
- [32] N. Fuzzati, B. Gabetta, I. Strepponi und F. Villa. „High-Performance Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Multiple Mass Spectrometry Studies of Hyperforin Degradation Products“. In: *Journal of Chromatography A*. 17th Montreux Symposium on Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, Supercritical Fluid Chromatography–Mass Spectrometry, Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry 926.1 (2001), S. 187–198. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01000-7 (siehe S. 26).
- [33] V. Vajs, S. Vugdelija, S. Trifunović, I. Karadzić, N. Juranić, S. Macura und S. Milosavljević. „Further Degradation Product of Hyperforin from *Hypericum Perforatum* (St John’s Wort)“. In: *Fitoterapia* 74.5 (2003), S. 439–444 (siehe S. 26).
- [34] C. Erdelmeier, E. Grethlein, F. Lang und R. Oschmann. „Stable Extract of *Hypericum Perforatum* L., Process for Preparing the Same and Pharmaceutical Compositions“. Europ. Pat. 0854726B1. Schwabe Dr Willmar GmbH. 1998 (siehe S. 26).
- [35] L. Cervo, M. Rozio, C. Ekalle-Soppo, G. Guiso, P. Morazzoni und S. Caccia. „Role of Hyperforin in the Antidepressant-like Activity of *Hypericum Perforatum* Extracts“. In: *Psychopharmacology* 164.4 (2002), S. 423–428. DOI: 10.1007/s00213-002-1229-5 (siehe S. 26).
- [36] CAJ Erdelmeier, K Klessing, S Renzi und H Hauer. „New Hyperforin Analogues from *Hypericum Perforatum* and a Stable Dicyclohexylammonium Salt of Hyperforin“. In: *Luijendijk TJC, Verpoorte R (eds) 2000 Years of Natural*

Products Research- Past, Present and Future. Vrije Univeriteit, Amsterdam, The Netherlands (1999) (siehe S. 26).

- [37] L. Verotta, G. Appendino, E. Belloro, F. Bianchi, O. Sterner, M. Lovati und E. Bombardelli. „Synthesis and Biological Evaluation of Hyperforin Analogues. Part I. Modification of the Enolized Cyclohexanedione Moiety“. In: *Journal of Natural Products* 65.4 (2002), S. 433–438. DOI: 10.1021/np0105681 (siehe S. 26).
- [38] J.-L. Wolfender, L. Verotta, L. Belvisi, N. Fuzzati und K. Hostettmann. „Structural Investigations Isomeric Oxidised Forms of Hyperforin by HPLC-NMR and HPLC-MSn“. In: *Phytochemical Analysis* 14.5 (2003), S. 290–297. DOI: 10.1002/pca.718 (siehe S. 26).
- [39] J. Füller, T. Kellner, M. Gaid, L. Beerhues und C. C. Müller-Goymann. „Stabilization of Hyperforin Dicyclohexylammonium Salt with Dissolved Albumin and Albumin Nanoparticles for Studying Hyperforin Effects on 2D Cultivation of Keratinocytes in Vitro“. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 126 (2018), S. 115–122. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.08.009 (siehe S. 26, 114, 161–163, 178).
- [40] P. Maisenbacher und K. A. Kovar. „Adhyperforin: A Homologue of Hyperforin from *Hypericum Perforatum*“. In: *Planta Medica* 58.3 (1992), S. 291–293. DOI: 10.1055/s-2006-961463 (siehe S. 27).
- [41] A. G. Jensen, S. H. Hansen und E. O. Nielsen. „Adhyperforin as a Contributor to the Effect of *Hypericum Perforatum* L. in Biochemical Models of Antidepressant Activity“. In: *Life Sciences* 68.14 (2001), S. 1593–1605. DOI: 10.1016/s0024-3205(01)00946-8 (siehe S. 27).
- [42] F. Danhier, O. Feron und V. Préat. „To Exploit the Tumor Microenvironment: Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery“. In: *Journal of Controlled Release* 148.2 (2010), S. 135–146. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.08.027 (siehe S. 27).

-
- [43] S. Stegemann, F. Leveiller, D. Franchi, H. de Jong und H. Lindén. „When Poor Solubility Becomes an Issue: From Early Stage to Proof of Concept“. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 31.5 (2007), S. 249–261. DOI: 10.1016/j.ejps.2007.05.110 (siehe S. 27).
- [44] *Europäisches Arzneibuch 9.0 - 9.1: Amtliche deutsche Ausgabe*. 1. Aufl. Deutscher Apotheker Verlag, 2018 (siehe S. 27).
- [45] G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah und J. R. Crison. „A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability“. In: *Pharmaceutical Research* 12.3 (1995), S. 413–420. DOI: 10.1023/a:1016212804288 (siehe S. 27).
- [46] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy und P. J. Feeney. „Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings“. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. In Vitro Models for Selection of Development Candidates 23.1 (1997), S. 3–25. DOI: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1 (siehe S. 27).
- [47] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan und J. J. Wendoloski. „A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases“. In: *Journal of Combinatorial Chemistry* 1.1 (1999), S. 55–68. DOI: 10.1021/cc9800071 (siehe S. 27).
- [48] J. Kreuter. „Influence of the Surface Properties on Nanoparticle-Mediated Transport of Drugs to the Brain“. In: *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 4.5 (2004), S. 484–488. DOI: 10.1166/jnn.2003.077 (siehe S. 28).
- [49] A. J. Sawyer, J. M. Piepmeier und W. M. Saltzman. „New Methods for Direct Delivery of Chemotherapy for Treating Brain Tumors“. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 79.3-4 (2006), S. 141–152 (siehe S. 28).
- [50] R. Sivaramakrishnan, C. Nakamura, W. Mehnert, H. C. Korting, K. D. Kramer und M. Schäfer-Korting. „Glucocorticoid Entrapment into Lipid Carriers — Characterisation by Piezoelectric Spectroscopy and Influence on Dermal Uptake“.

- In: *Journal of Controlled Release* 97.3 (2004), S. 493–502. DOI: 10.1016/j.jconrel.2004.04.001 (siehe S. 28).
- [51] N. Otberg, H. Richter, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, W. Sterry und J. Lademann. „Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites“. In: *Journal of Investigative Dermatology* 122.1 (2004), S. 14–19. DOI: 10.1046/j.0022-202X.2003.22110.x (siehe S. 28).
- [52] M. M. A. Abdel-Mottaleb, D. Neumann und A. Lamprecht. „In Vitro Drug Release Mechanism from Lipid Nanocapsules (LNC)“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 390.2 (2010), S. 208–213. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.02.001 (siehe S. 28).
- [53] A. Lauterbach und C. C. Mueller-Goymann. „Development, Formulation, and Characterization of an Adapalene-Loaded Solid Lipid Microparticle Dispersion for Follicular Penetration“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 466.1 (2014), S. 122–132. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.02.050 (siehe S. 28).
- [54] H. Bunjes und B. Siekmann. „Manufacture, Characterization and Application of Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery System“. In: *Nanoparticulate Drug Delivery Systems. Informa Healthcare* (2007), S. 213–268 (siehe S. 28).
- [55] L. Verotta, E. Lovaglio, O. Sterner, G. Appendino und E. Bombardelli. „Modulation of Chemoselectivity by Protein Additives. Remarkable Effects in the Oxidation of Hyperforin“. In: *The Journal of Organic Chemistry* 69.23 (2004), S. 7869–7874. DOI: 10.1021/jo048857s (siehe S. 29).
- [56] Y.-J. Hu, Y. Liu, T.-Q. Sun, A.-M. Bai, J.-Q. Lü und Z.-B. Pi. „Binding of Anti-Inflammatory Drug Cromolyn Sodium to Bovine Serum Albumin“. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 39.4 (2006), S. 280–285. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2006.04.004 (siehe S. 29).
- [57] R. Tantra, J. Tompkins und P. Quincey. „Characterisation of the De-Agglomeration Effects of Bovine Serum Albumin on Nanoparticles in Aqueous Suspension“. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75.1 (2010), S. 275–281. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.08.049 (siehe S. 29).

-
- [58] A. O. Elzoghby, W. M. Samy und N. A. Elgindy. „Albumin-Based Nanoparticles as Potential Controlled Release Drug Delivery Systems“. In: *Journal of Controlled Release* 157.2 (2012), S. 168–182. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.07.031 (siehe S. 29).
- [59] L. Hashem, M. Swedrowska und D. Vllasaliu. „Intestinal Uptake and Transport of Albumin Nanoparticles: Potential for Oral Delivery“. In: *Nanomedicine (London, England)* 13.11 (2018), S. 1255–1265. DOI: 10.2217/nnm-2018-0029 (siehe S. 29).
- [60] J. Huang, B. Wu, Z. Zhou, S. Hu, H. Xu, Y. Piao, H. Zheng, J. Tang, X. Liu und Y. Shen. „Drug-Binding Albumins Forming Stabilized Nanoparticles for Efficient Anticancer Therapy“. In: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 21 (2019). DOI: 10.1016/j.nano.2019.102058 (siehe S. 29).
- [61] H. Wartlick, K. Michaelis, S. Balthasar, K. Strebhardt, J. Kreuter und K. Langer. „Highly Specific HER2-Mediated Cellular Uptake of Antibody-Modified Nanoparticles in Tumour Cells“. In: *Journal of drug targeting* 12 (2004), S. 461–71. DOI: 10.1080/10611860400010697 (siehe S. 29).
- [62] R. L. Gundry, Q. Fu, C. A. Jelinek, J. E. Van Eyk und R. J. Cotter. „Investigation of an Albumin-Enriched Fraction of Human Serum and Its Albuminome“. In: *Proteomics. Clinical applications* 1.1 (2007), S. 73–88. DOI: 10.1002/prca.200600276 (siehe S. 29).
- [63] G. Shevalkar, R. Pai und P. Vavia. „Nanostructured Lipid Carrier of Propofol: A Promising Alternative to Marketed Soybean Oil-Based Nanoemulsion“. In: *AAPS PharmSciTech* 20.5 (2019), S. 201. DOI: 10.1208/s12249-019-1408-x (siehe S. 29).
- [64] M. R. Mozafari, J. Flanagan, L. Matia-Merino, A. Awati, A. Omri, Z. E. Sun-tres und H. Singh. „Recent Trends in the Lipid-Based Nanoencapsulation of Antioxidants and Their Role in Foods“. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86.13 (2006), S. 2038–2045. DOI: 10.1002/jsfa.2576 (siehe S. 30).

- [65] J. Weiss, E. A. Decker, D. J. McClements, K. Kristbergsson, T. Helgason und T. Awad. „Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components“. In: *Food Biophysics* 3.2 (2008), S. 146–154. DOI: 10.1007/s11483-008-9065-8 (siehe S. 30, 34).
- [66] R. J. Prankerd und V. J. Stella. „The Use of Oil-in-Water Emulsions as a Vehicle for Parenteral Drug Administration“. In: *Journal of Parenteral Science and Technology: A Publication of the Parenteral Drug Association* 44.3 (1990), S. 139–149 (siehe S. 30).
- [67] K. Hippalgaonkar, S. Majumdar und V. Kansara. „Injectable Lipid Emulsions—Advancements, Opportunities and Challenges“. In: *AAPS PharmSciTech* 11.4 (2010), S. 1526–1540. DOI: 10.1208/s12249-010-9526-5 (siehe S. 30).
- [68] S. Lucks und R. Müller. „Arzneistoffträger aus festen Lipidteilchen. Feste Lipidnanosphären (SLN)“. Europ. Pat. 0605497A1. Medac Gesellschaft für Klinische Spezialpräparate mbH. 1994 (siehe S. 30).
- [69] K. Westesen. „Novel Lipid-Based Colloidal Dispersions as Potential Drug Administration Systems – Expectations and Reality“. In: *Colloid and Polymer Science* 278.7 (2000), S. 608–618. DOI: 10.1007/s003969900257 (siehe S. 30).
- [70] R. H. Müller, K. Mäder und S. Gohla. „Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery – a Review of the State of the Art“. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50.1 (2000), S. 161–177. DOI: 10.1016/S0939-6411(00)00087-4 (siehe S. 30).
- [71] H. Bunjes. „Lipid Nanoparticles for the Delivery of Poorly Water-Soluble Drugs“. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62.11 (2010), S. 1637–1645. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2010.01024.x (siehe S. 30).
- [72] K. Göke, T. Lorenz, A. Repanas, F. Schneider, D. Steiner, K. Baumann, H. Bunjes, A. Dietzel, J. H. Finke, B. Glasmacher und A. Kwade. „Novel Strategies for the Formulation and Processing of Poorly Water-Soluble Drugs“. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Innovative Processes for Bio-

Pharmaceuticals and Poorly Water-Soluble API 126 (2018), S. 40–56. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.05.008 (siehe S. 30).

- [73] E. Kupetz und H. Bunjes. „Lipid Nanoparticles: Drug Localization Is Substance-Specific and Achievable Load Depends on the Size and Physical State of the Particles“. In: *Journal of Controlled Release* 189 (2014), S. 54–64. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.06.007 (siehe S. 31).
- [74] W. Mehnert, A. D. zur Mühlen, A. Dingler, H. Weyhers und R. H. Mueller. „Solid Lipid Nanoparticles - Ein Neuartiger Wirkstoff-Carrier Für Kosmetika Und Pharmazeutika 2. Mitteilung: Wirkstoff-Inkorporation, Freisetzung Und Sterilisierbarkeit“. In: *Pharmazeutische Industrie* (1997) (siehe S. 31).
- [75] M. Üner und G. Yener. „Importance of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) in Various Administration Routes and Future Perspectives“. In: *International Journal of Nanomedicine* 2.3 (2007), S. 289 (siehe S. 31, 143).
- [76] S. H. G. V. Jennings. „Encapsulation of Retinoids in Solid Lipid Nanoparticles (SLN)“. In: *Journal of Microencapsulation* 18.2 (2001), S. 149–158. DOI: 10.1080/02652040010000361 (siehe S. 31, 143).
- [77] K. Langer, S. Balthasar, V. Vogel, N. Dinauer, H. von Briesen und D. Schubert. „Optimization of the Preparation Process for Human Serum Albumin (HSA) Nanoparticles“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 257.1 (2003), S. 169–180. DOI: 10.1016/S0378-5173(03)00134-0 (siehe S. 32).
- [78] E. J. Cohn, W. L. Hughes und J. H. Weare. „Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. XIII. Crystallization of Serum Albumins from Ethanol-Water Mixtures1a,b“. In: *Journal of the American Chemical Society* 69.7 (1947), S. 1753–1761. DOI: 10.1021/ja01199a051 (siehe S. 32).
- [79] J. J. Marty, R. C. Oppenheim und P. Speiser. „Nanoparticles—a New Colloidal Drug Delivery System“. In: *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 53.1 (1978), S. 17–23 (siehe S. 33).

- [80] H. Mohammad-Beigi, S. Shojaosadati, D. Morshedi, N. Mirzazadeh und A. Arpanaei. „The Effects of Organic Solvents on the Physicochemical Properties of Human Serum Albumin Nanoparticles“. In: *Iranian Journal of Biotechnology* 14.1 (2016), S. 45–50. DOI: 10.15171/ijb.1168 (siehe S. 33).
- [81] A. F. S. A. Habeeb und R. Hiramoto. „Reaction of Proteins with Glutaraldehyde“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 126.1 (1968), S. 16–26. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90554-7 (siehe S. 33).
- [82] C. Weber, C. Coester, J. Kreuter und K. Langer. „Desolvation Process and Surface Characterisation of Protein Nanoparticles“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 194.1 (2000), S. 91–102. DOI: 10.1016 / S0378-5173(99)00370-1 (siehe S. 33, 104).
- [83] T. Takigawa und Y. Endo. „Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health“. In: *Journal of Occupational Health* 48.2 (2006), S. 75–87. DOI: 10.1539/joh.48.75 (siehe S. 33).
- [84] P. Suwannoi, M. Chomnawang, N. Sarisuta, S. Reichl und C. C. Müller-Goymann. „Development of Acyclovir-Loaded Albumin Nanoparticles and Improvement of Acyclovir Permeation Across Human Corneal Epithelial T Cells“. In: *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics: The Official Journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 33.10 (2017), S. 743–752. DOI: 10.1089/jop.2017.0057 (siehe S. 33, 53, 104, 164).
- [85] V. A. Borzova, K. A. Markossian, N. A. Chebotareva, S. Y. Kleymenov, N. B. Poliansky, K. O. Muranov, V. A. Stein-Margolina, V. V. Shubin, D. I. Markov und B. I. Kurganov. „Kinetics of Thermal Denaturation and Aggregation of Bovine Serum Albumin“. In: *PLoS ONE* 11.4 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0153495 (siehe S. 33, 96).
- [86] J. M. Gallo, C. T. Hung und D. G. Perrier. „Analysis of Albumin Microsphere Preparation“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 22.1 (1984), S. 63–74. DOI: 10.1016/0378-5173(84)90046-2 (siehe S. 33).

-
- [87] S. Schultz, G. Wagner und J. Ulrich. „Hochdruckhomogenisation Als Ein Verfahren Zur Emulsionsherstellung“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 74 (2002), S. 901–909. DOI: 10.1002/1522-2640(200207)74:7<901::AID-CITE901>3.0.CO;2-7 (siehe S. 33, 34).
- [88] A. Treiber und P. Kiefer. „Kavitation Und Turbulenz Als Zerkleinerungsmechanismen Bei Der Homogenisation von O/W-Emulsionen“. In: *Chemie Ingenieur Technik* 48.3 (1976), S. 259–259. DOI: 10.1002/cite.330480325 (siehe S. 34).
- [89] S. Gehrman und H. Bunjes. „Influence of Membrane Material on the Production of Colloidal Emulsions by Premix Membrane Emulsification“. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Innovative Processes for Bio-Pharmaceuticals and Poorly Water-Soluble API 126 (2018), S. 140–148. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.11.006 (siehe S. 34).
- [90] P. Erfle, J. Riewe, H. Bunjes und A. Dietzel. „Optically Monitored Segmented Flow for Controlled Ultra-Fast Mixing and Nanoparticle Precipitation“. In: *Microfluidics and Nanofluidics* 21.12 (2017), S. 179. DOI: 10.1007/s10404-017-2016-2 (siehe S. 34).
- [91] B. Sjöström, A. Kaplun, Y. Talmon und B. Cabane. „Structures of Nanoparticles Prepared from Oil-in-Water Emulsions“. In: *Pharmaceutical Research* 12.1 (1995), S. 39–48. DOI: 10.1023/A:1016278302046 (siehe S. 35).
- [92] K. Göke und H. Bunjes. „Parameters Influencing the Course of Passive Drug Loading into Lipid Nanoemulsions“. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Innovative Processes for Bio-Pharmaceuticals and Poorly Water-Soluble API 126 (2018), S. 123–131. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.05.009 (siehe S. 35, 36).
- [93] K. Göke und H. Bunjes. „Carrier Characteristics Influence the Kinetics of Passive Drug Loading into Lipid Nanoemulsions“. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Innovative Processes for Bio-Pharmaceuticals and Poorly Water-Soluble API 126 (2018), S. 132–139. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.08.004 (siehe S. 35, 36).

- [94] DIN 5008:2011-04, *Schreib- Und Gestaltungsregeln Für Die Textverarbeitung*. 5008. Beuth Verlag GmbH, 2011. DOI: 10.31030/1739875 (siehe S. 39).
- [95] DIN 5008:2019-04, *Schreib- Und Gestaltungsregeln Für Die Text- Und Informationsverarbeitung*. 5008. Beuth Verlag GmbH, 2019. DOI: 10.31030/3051075 (siehe S. 39).
- [96] DIN 55301:1978-09, *Gestaltung Statistischer Tabellen*. 55301. Beuth Verlag GmbH, 1978. DOI: 10.31030/1275430 (siehe S. 39).
- [97] *Drugbank - Hyperforin*. In: *DrugBank*. Hrsg. von DrugBank. 2016 (siehe S. 40).
- [98] S. Ge, K. Kojio, A. Takahara und T. Kajiyama. „Bovine Serum Albumin Adsorption onto Immobilized Organotrichlorosilane Surface: Influence of the Phase Separation on Protein Adsorption Patterns“. In: *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition* 9.2 (1998), S. 131–150. DOI: 10.1163 / 156856298x00479 (siehe S. 41).
- [99] S. Ku und R. Velagaleti. „Solutol HS15 as a Novel Excipient“. In: *PharmTech* 108 (2010), S. 110 (siehe S. 42).
- [100] S. Chauvet, A. Barras, R. Boukherroub und A. Bouron. „Lipid Nanocapsules Containing the Non-Ionic Surfactant Solutol HS15 Inhibit the Transport of Calcium through Hyperforin-Activated Channels in Neuronal Cells“. In: *Neuropharmacology* 99 (2015), S. 726–734. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.043 (siehe S. 42).
- [101] *Arzneibuch-Kommentar: Wissenschaftliche Erläuterungen Zum Arzneibuch*. 1. Aufl. inkl. 61 Akt.lfg. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2019 (siehe S. 43, 175).
- [102] Franz Büchner, Ekkehard Grundmann. *Spezielle Pathologie*. 7. Aufl. München: Urban & Schwarzenberg, 1986 (siehe S. 44).
- [103] P. J. Price und E. A. Gregory. „Relationship between in Vitro Growth Promotion and Biophysical and Biochemical Properties of the Serum Supplement“. In: *In Vitro* 18.6 (1982), S. 576–584. DOI: 10.1007/BF02810081 (siehe S. 45).

-
- [104] M. Baker. „Reproducibility: Respect Your Cells!“ In: *Nature* 537 (2016), S. 433–435. DOI: 10.1038/537433a (siehe S. 45).
- [105] M. M. Rahman und Z. Govindarajulu. „A Modification of the Test of Shapiro and Wilk for Normality“. In: *Journal of Applied Statistics* 24.2 (1997), S. 219–236. DOI: 10.1080/02664769723828 (siehe S. 46).
- [106] J. Finke, J. Schur, C. Richter, T. Gothsch, A. Kwade, S. Büttgenbach und C. Müller-Goymann. „The Influence of Customized Geometries and Process Parameters on Nanoemulsion and Solid Lipid Nanoparticle Production in Microsystems“. In: *Chemical Engineering Journal* 209 (2012), S. 126–137. DOI: 10.1016/j.cej.2012.07.115 (siehe S. 51, 56, 61, 122).
- [107] G. E. P. Box und K. B. Wilson. „On the Experimental Attainment of Optimum Conditions“. In: *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 13.1 (1951), S. 1–38. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x (siehe S. 51).
- [108] K. Siebertz, D. van Bebber und T. Hochkirchen. *Statistische Versuchsplanung: Design of Experiments*. 2. Aufl. 2017. Berlin: Springer Vieweg, 2017. 508 S. (siehe S. 52).
- [109] S. Ranade und P. Thiagarajan. „Selection of a Design for Response Surface“. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 263 (2017), S. 022043. DOI: 10.1088/1757-899X/263/2/022043 (siehe S. 52).
- [110] R. H. Myers, D. C. Montgomery und C. M. Anderson-Cook. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. 4. Aufl. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2016. 856 S. (siehe S. 52).
- [111] Z. Zhang und B. Xiaofeng. „Comparison about the Three Central Composite Designs with Simulation“. In: *2009 International Conference on Advanced Computer Control*. 2009 International Conference on Advanced Computer Control. 2009, S. 163–167. DOI: 10.1109/ICACC.2009.48 (siehe S. 52).

- [112] M. A. Schubert und C. C. Müller-Goymann. „Characterisation of Surface-Modified Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Influence of Lecithin and Nonionic Emulsifier“. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61.1–2 (2005), S. 77–86. DOI: 10.1016/j.ejpb.2005.03.006 (siehe S. 57).
- [113] C. Richter, T. Krah und S. Büttgenbach. „Novel 3D Manufacturing Method Combining Microelectrical Discharge Machining and Electrochemical Polishing“. In: *Microsystem Technologies* 18.7-8 (2012), S. 1109–1118. DOI: 10.1007/s00542-012-1452-x (siehe S. 61).
- [114] ISO 22412:2017 (En), *Particle Size Analysis - Dynamic Light Scattering (DLS)*. 22412:2017. 2017 (siehe S. 69).
- [115] J. Stetefeld, S. A. McKenna und T. R. Patel. „Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences“. In: *Biophysical Reviews* 8.4 (2016), S. 409–427. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6 (siehe S. 69).
- [116] ISO 13320:2009 (En), *Particle Size Analysis — Laser Diffraction Methods*. 2009 (siehe S. 70).
- [117] C. Wohlfarth. *Static Dielectric Constants of Pure Liquids and Binary Liquid Mixtures: Supplement to IV/6*. Hrsg. von M. D. Lechner. Physical Chemistry. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008 (siehe S. 74).
- [118] *Quality Guidelines : ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Q2(R1). 2005 (siehe S. 77, 117).
- [119] T. Mosmann. „Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays“. In: *Journal of Immunological Methods* 65.1-2 (1983), S. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4 (siehe S. 83).
- [120] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff und M. R. Boyd. „Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines“. In: *Cancer Research* 48.17 (1988), S. 4827–4833 (siehe S. 83).

-
- [121] *Quality Guidelines : ICH 1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products*. 2003. URL: <https://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html> (besucht am 15.03.2019) (siehe S. 87).
- [122] S. G. Johnson. *NIST Standard Reference Database 1A V17*. 2014. URL: <https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v17> (besucht am 08.03.2019) (siehe S. 89).
- [123] M. Gaid, P. Haas, T. Beuerle, S. Scholl und L. Beerhues. „Hyperforin Production in *Hypericum Perforatum* Root Cultures“. In: *Journal of Biotechnology* 222 (2016), S. 47–55. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.02.016 (siehe S. 89).
- [124] V. M. Gun’ko, A. V. Klyueva, Y. N. Levchuk und R. Leboda. „Photon Correlation Spectroscopy Investigations of Proteins“. In: *Advances in Colloid and Interface Science* 105.1 (2003), S. 201–328. DOI: 10.1016/S0001-8686(03)00091-5 (siehe S. 93).
- [125] A. Faraone, C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, H. D. Middendorf, P. Migliardo und V. Villari. „QENS and PCS Study of Aqueous BSA–PEO ‘crowded’ Solutions“. In: *Physica B: Condensed Matter* 276-278 (2000), S. 524–525. DOI: 10.1016/S0921-4526(99)01508-2 (siehe S. 93).
- [126] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self und S. Seal. „Protein Adsorption and Cellular Uptake of Cerium Oxide Nanoparticles as a Function of Zeta Potential“. In: *Biomaterials* 28.31 (2007), S. 4600–4607. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.029 (siehe S. 96).
- [127] *DIN EN 15490:2007-11, Ethanol zur Verwendung als Blendkomponente in Ottokraftstoff - Bestimmung des pHe-Wertes*. Beuth Verlag GmbH. DOI: 10.31030/9845123 (siehe S. 96).
- [128] J. Y. Jun, H. H. Nguyen, S.-Y.-R. Paik, H. S. Chun, B.-C. Kang und S. Ko. „Preparation of Size-Controlled Bovine Serum Albumin (BSA) Nanoparticles by a Modified Desolvation Method“. In: *Food Chemistry* 127.4 (2011), S. 1892–1898. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.02.040 (siehe S. 97).

- [129] A. Martínez, I. Iglesias, R. Lozano, J. M. Teijón und M. D. Blanco. „Synthesis and Characterization of Thiolated Alginate-Albumin Nanoparticles Stabilized by Disulfide Bonds. Evaluation as Drug Delivery Systems“. In: *Carbohydrate Polymers* 83.3 (2011), S. 1311–1321. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.09.038 (siehe S. 99).
- [130] L. A. Glaser, A. T. Paulson, R. A. Speers, R. Y. Yada und D. Rousseau. „Foaming Behavior of Mixed Bovine Serum Albumin–Protamine Systems“. In: *Food Hydrocolloids* 21.4 (2007), S. 495–506. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2006.05.008 (siehe S. 99).
- [131] T. Gothsch, J. H. Finke, S. Beinert, C. Lesche, J. Schur, S. Büttgenbach, C. Müller-Goymann und A. Kwade. „Effect of Microchannel Geometry on High-Pressure Dispersion and Emulsification“. In: *Chemical Engineering & Technology* 34.3 (2011), S. 335–343. DOI: 10.1002/ceat.201000421 (siehe S. 122).
- [132] A. Fahr und R. Voigt. *Voigt Pharmazeutische Technologie: Für Studium und Beruf*. 12., völlig neu bearb. Aufl. 2015. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, 2015. 688 S. (siehe S. 128).
- [133] K. Westesen und B. Siekmann. „Investigation of the Gel Formation of Phospholipid-Stabilized Solid Lipid Nanoparticles“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 151.1 (1997), S. 35–45. DOI: 10.1016/S0378-5173(97)04890-4 (siehe S. 133).
- [134] K. Jores, W. Mehnert, M. Drechsler, H. Bunjes, C. Johann und K. Mäder. „Investigations on the Structure of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles by Photon Correlation Spectroscopy, Field-Flow Fractionation and Transmission Electron Microscopy“. In: *Journal of Controlled Release* 95.2 (2004), S. 217–227. DOI: 10.1016/j.jconrel.2003.11.012 (siehe S. 133).
- [135] C. Freitas und R. H. Müller. „Effect of Light and Temperature on Zeta Potential and Physical Stability in Solid Lipid Nanoparticle (SLNTM) Dispersions“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 168.2 (1998), S. 221–229. DOI: 10.1016/S0378-5173(98)00092-1 (siehe S. 134).

-
- [136] J. D. Weete. „Preferential Degradation of Noncholine Phosphatides in Soybean Lecithin by Thermalization“. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71.11 (1994), S. 1195–1199. DOI: 10.1007/BF02540536 (siehe S. 136).
- [137] U. Fischer. *Tabellenbuch Metall*. Haan-Gruiten: Europa-Lehrmittel, 2005. 392 S. (siehe S. 139, 141).
- [138] L. P. Jameson, N. W. Smith, O. Annunziata und S. V. Dzyuba. „Interaction of BODIPY Dyes with Bovine Serum Albumin: A Case Study on the Aggregation of a Click-BODIPY Dye“. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 18.21 (2016), S. 14182–14185. DOI: 10.1039/c6cp00420b (siehe S. 158).
- [139] M. Müller, K. Essin, K. Hill, H. Beschmann, S. Rubant, C. Schempp, M. Gollasch, W. Boehncke, C. Harteneck, W. Müller und K. Leuner. „Specific TRPC6 Channel Activation, a Novel Approach to Stimulate Keratinocyte Differentiation“. In: *Journal of Biological Chemistry* 283.49 (2008), S. 33942–33954. DOI: 10.1074/jbc.M801844200 (siehe S. 161).
- [140] G. L. Francis. „Albumin and Mammalian Cell Culture: Implications for Biotechnology Applications“. In: *Cytotechnology* 62.1 (2010), S. 1–16. DOI: 10.1007/s10616-010-9263-3 (siehe S. 162).
- [141] S. Zhang, H. Gao und G. Bao. „Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis“. In: *ACS Nano* 9.9 (2015), S. 8655–8671. DOI: 10.1021/acs.nano.5b03184 (siehe S. 164).
- [142] R. P. Das, V. V. Gandhi, B. G. Singh, A. Kunwar, N. N. Kumar und K. I. Priyadarshini. „Preparation of Albumin Nanoparticles: Optimum Size for Cellular Uptake of Entrapped Drug (Curcumin)“. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 567 (2019), S. 86–95. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2019.01.043 (siehe S. 164).
- [143] H. Liang, C. Jin, Y. Tang, F. Wang, C. Ma und Y. Yang. „Cytotoxicity of Silica Nanoparticles on HaCaT Cells“. In: *Journal of Applied Toxicology* 34.4 (2014), S. 367–372. DOI: 10.1002/jat.2953 (siehe S. 164).

- [144] R. Shukla, A. Kumar, A. Pandey, S. Singh und A. Dhawan. „Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress-Mediated Apoptosis in Human Keratinocyte Cells“. In: *Journal of Biomedical Nanotechnology* 7.1 (2011), S. 100–101. DOI: 10.1166/jbn.2011.1221 (siehe S. 164).
- [145] G. Sahay, D. Y. Alakhova und A. V. Kabanov. „Endocytosis of Nanomedicines“. In: *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 145.3 (2010), S. 182–195. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.036 (siehe S. 164, 178).
- [146] A. Lamprecht und J.-P. Benoit. „Etoposide Nanocarriers Suppress Glioma Cell Growth by Intracellular Drug Delivery and Simultaneous P-Glycoprotein Inhibition“. In: *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 112.2 (2006), S. 208–213. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.02.014 (siehe S. 166).
- [147] C. Maupas, B. Moulari, A. Béduneau, A. Lamprecht und Y. Pellequer. „Surfactant Dependent Toxicity of Lipid Nanocapsules in HaCaT Cells“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 411.1-2 (2011), S. 136–141. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.056 (siehe S. 166).
- [148] K. Fischer und M. Schmidt. „Pitfalls and Novel Applications of Particle Sizing by Dynamic Light Scattering“. In: *Biomaterials* 98 (2016), S. 79–91. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.05.003 (siehe S. 172).
- [149] H. B. Bull. „Adsorption of Bovine Serum Albumin on Glass“. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 19 (1956), S. 464–471. DOI: 10.1016/0006-3002(56)90469-3 (siehe S. 172).
- [150] J. Rager. „Quantitative Analyse der Proteinadsorption an Primärpackmittel - unter Verwendung von statistischer Versuchsplanung -“. Dissertation. Berlin: Freie Universität Berlin, 2013. 118 S. (siehe S. 172, 173).
- [151] C. Schempp, T. Windeck, S. Hezel und J. Simon. „Topical Treatment of Atopic Dermatitis with St. John’s Wort Cream - A Randomized, Placebo Controlled, Double Blind Half-Side Comparison“. In: *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 10 Suppl 4 (2003), S. 31–7. DOI: 10.1078/1433-187X-00306 (siehe S. 174).

-
- [152] J. L. Betker, J. Gomez und T. J. Anchordoquy. „The Effects of Lipoplex Formulation Variables on the Protein Corona and Comparisons with in Vitro Transfection Efficiency“. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 171.3 (2013), S. 261–268. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.07.024 (siehe S. 174).
- [153] S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, C. Reinhardt, K. Landfester, H. Schild, M. Maskos, S. K. Knauer und R. H. Stauber. „Rapid Formation of Plasma Protein Corona Critically Affects Nanoparticle Pathophysiology“. In: *Nature Nanotechnology* 8.10 (2013), S. 772–781. DOI: 10.1038/nnano.2013.181 (siehe S. 174).
- [154] P. van Hoogevest. „Review – An Update on the Use of Oral Phospholipid Excipients“. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Use of Phospholipids in Oral Drug Delivery 108 (2017), S. 1–12. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.07.008 (siehe S. 175).
- [155] N. P. Das und T. A. Pereira. „Effects of Flavonoids on Thermal Autoxidation of Palm Oil: Structure-Activity Relationships“. In: *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67.4 (1990), S. 255–258. DOI: 10.1007/BF02540652 (siehe S. 175).
- [156] M. C. Dobarganes. *Action of Natural Antioxidants during Frying*. AOCS Lipid Library, 2012. DOI: 10.21748/LipidLibrary.39208 (siehe S. 175).
- [157] T. Malkin. „The Polymorphism of Glycerides“. In: *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids* 2 (1954), S. 1–50. DOI: 10.1016/0079-6832(54)90003-8 (siehe S. 176).
- [158] R. H. Müller, M. Radtke und S. A. Wissing. „Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) in Cosmetic and Dermatological Preparations“. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*. Human Skin: The Medium of Touch 54 (2002), S131–S155. DOI: 10.1016/S0169-409X(02)00118-7 (siehe S. 176).
- [159] Sönke Gramdor. „Schmelzeemulgieren Im Hochdruckhomogenisator Zur Herstellung von Kolloidalen Festen Triglyceridpartikeln“. Berlin: Technische Universität Berlin, 2011 (siehe S. 176).

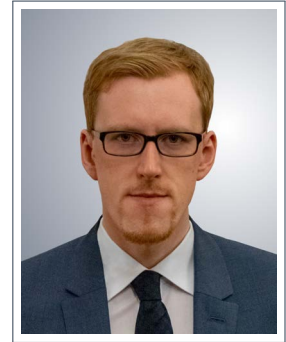
- [160] H. Bunjes, F. Steiniger und W. Richter. „Visualizing the Structure of Triglyceride Nanoparticles in Different Crystal Modifications“. In: *Langmuir* 23.7 (2007), S. 4005–4011. DOI: 10.1021/la062904p (siehe S. 176).
- [161] J. Oakes. „Thermally Denatured Proteins. Nuclear Magnetic Resonance, Binding Isotherm and Chemical Modification Studies of Thermally Denatured Bovine Serum Albumin“. In: *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 72.0 (1976), S. 228–237. DOI: 10.1039/F19767200228 (siehe S. 177).
- [162] U. Kragh-Hansen. „Structure and Ligand Binding Properties of Human Serum Albumin.“ In: *Danish medical bulletin* 37.1 (1990), S. 57–84 (siehe S. 177).
- [163] C. Czeslik. „Factors Ruling Protein Adsorption“. In: *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 218.7 (2004), S. 771–801. DOI: 10.1524 / zpch.218.7.771.35722 (siehe S. 177).
- [164] J. E. Schnitzer. „Gp60 Is an Albumin-Binding Glycoprotein Expressed by Continuous Endothelium Involved in Albumin Transcytosis“. In: *The American Journal of Physiology* 262 (1 Pt 2 1992), H246–254. DOI: 10.1152/ajpheart.1992.262.1.H246 (siehe S. 178).
- [165] R. H. Müller, M. Radtke und S. A. Wissing. „Nanostructured Lipid Matrices for Improved Microencapsulation of Drugs“. In: *International Journal of Pharmaceutics* 242.1 (2002), S. 121–128. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00180-1 (siehe S. 180).
- [166] S. W. Tan, N. Billa, C. R. Roberts und J. C. Burley. „Surfactant Effects on the Physical Characteristics of Amphotericin B-Containing Nanostructured Lipid Carriers“. In: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 372.1 (2010), S. 73–79. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.09.030 (siehe S. 180).
- [167] H. Takada, J. Yonekawa, M. Matsumoto, K. Furuya und M. Sokabe. „Hyperforin/HP- β -Cyclodextrin Enhances Mechanosensitive Ca²⁺ Signaling in HaCaT Keratinocytes and in Atopic Skin Ex Vivo Which Accelerates Wound Healing“.

In: *BioMed Research International* 2017 (2017). DOI: 10.1155/2017/8701801 (siehe S. 180).

- [168] H. Orth und P. Schmidt. „Stability and Stabilization of Hyperforin“. In: *Die Pharmazeutische Industrie* 62.1 (2000), S. 60–63 (siehe S. 180).

Thomas Kellner

Unteres Tor 17b
37154 Northeim
✉ diss@t-kellner.de
🌐 www.t-kellner.de



Persönliche Daten

Geburtsdatum 17.05.1989 Geburtsort Northeim
Familienstand ledig Staatsangehörigkeit deutsch

Bildungsweg

seit 09/2014 **Promotion**, *Institut für Pharmazeutische Technologie*, TU Braunschweig.
Promotionsthema: Kolloidale Hyperforin-Formulierungen

11/2011 **Master of Science (Dipl.-Ing.) - Pharmaceutical Engineering**, *TU Graz*, Ab-
bis 03/2014 *schlussnote: 1,7.*
Titel der Masterarbeit: Struktur und Morphologie von Wirkstoffen in Laminaten und deren Einfluss auf das Freisetzungsverhalten

09/2008 **Bachelor of Science (B.Sc.) - Pharmatechnik**, *HS Ostwestfalen-Lippe*, Ab-
bis 08/2011 *schlussnote: 1,9.*
Titel der Bachelorarbeit: Inline-Partikelgrößenbestimmung mit Hilfe einer PARSUM Sonde IPP 70-S zur Aufzeichnung und Überwachung von Granulierprozessen im Intensivmischer DIOSNA P1-6

08/2005 **Ausbildung zum Chemisch-technischen Assistenten (CTA) und**
bis 06/2007 **Erwerb der Fachhochschulreife**, *Akademie Göttingen*, *Abschlussnote: 2,1.*

08/2001 **Sekundarabschluss I - Realschulabschluss**, *Gutenberg Realschule Northeim*, Ab-
bis 07/2005 *schlussnote: 2,1.*

Berufserfahrungen

- seit 03/2019 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, *Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie*, TU Braunschweig.
Lehre, Praktikumsleiter: Instrumentelle Analytik (Seminar + Praktikum)
- 09/2014 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter**, *Institut für Pharmazeutische Technologie*, TU
bis 02/2019 Braunschweig.
Industrieraufträge: Herstellung von Nanoemulsionen, Partikelgrößenbestimmungen
Lehre: Mathematische und Statistische Methoden (Übung), Arzneiformenlehre (Praktikum),
Pharmazeutische Technologie (Praktikum)
- 12/2013 **Wissenschaftliche Hilfskraft**, *TU Graz*.
bis 01/2014 Rasterkraftmikroskopie zur Untersuchung des spontanen, berührungslosen Kristallwachstums
- 09/2011 **Wissenschaftliche Hilfskraft**, *HS Ostwestfalen-Lippe*.
bis 10/2011 Softwareprogrammierung zur Datenverarbeitung und Auswertung von Rohdaten einer Partikelgrößenmesssonde (Kooperation mit den Firmen Parsum und Diosna)
- 09/2010 **Studentische Hilfskraft**, *HS Ostwestfalen-Lippe*.
bis 08/2011 Entwicklung neuartiger Elektroden für die Titration, Planung neuer Praktikumsversuche,
Erstellung von SOPs für spezielle Hard- und Softwarepakete
- 06/2008 **Chemisch-technischer Assistent**, *Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen*.
bis 08/2008 Qualitätssicherung, Sterilitätsprüfungen von verschiedenen Filtersystemen
- 03/2008 **Chemisch-technischer Assistent**, *Institut für Organische und Biomolekulare Chemie*, Georg-August-Universität Göttingen.
bis 05/2008 Programmierung: Entwicklung einer abteilungsübergreifenden Backup-Lösung für Unix/
Windows-Systeme, Programmierung der dafür nötigen, individuellen Backup-Software
- 07/2007 **Praktikum zum Erwerb der Fachhochschulreife**, *Institut für Organische und*
bis 02/2008 *Biomolekulare Chemie*, Georg-August-Universität Göttingen.
Einrichten von GC und HPLC-Anlagen, mikrobiologische Tätigkeiten, abteilungsübergreifende
Linux- und Windowscomputersysteme installieren, konfigurieren und warten

Auszeichnungen

- 02/2015 1. Preis in der Kategorie Master-/ Diplomarbeiten
Beste Abschlussarbeit im Jahr 2014, ausgezeichnet mit dem Förderpreis Forum
Technik & Gesellschaft, dotiert mit 2.000 €
- 12/2011 Ehrung als Jahrgangsbester des Studiengangs Pharmatechnik

Weiterbildungen (Auswahl)

Soft Skills

- 02/2018 **Workshop, Bewusste Kommunikation**, *TU-Braunschweig*.
Mitarbeitergespräche vorbereiten und führen, Körpersprache, Kommunikationstraining
- 10/2014 **Workshop, Konfliktmanagement**, *TU-Braunschweig*.
verschiedenen Konfliktstile und -arten sowie Eskalationsstufen erkennen, Selbstreflexion des persönlichen Konfliktverhaltens

Pharmazie und Analytik

- 11/2017 **Schulung, HPLC-Analytik**, *Chrome Forum Hamburg*.
Spezielle Problemstellungen, Methodenentwicklung, Praktische Beispiele, Trends und Herausforderungen
- 02/2015 **Schulung, Drug Delivery Systeme**, *TU-Braunschweig*.
Arzneiformen mit besonderen Eigenschaften und ihre physikochemischen Grundlagen

Publikationen

Paper

- 2018 J. Füller, **T. Kellner**, M. Gaid, L. Beerhues, C.C. Müller-Goymann, Stabilization of hyperforin dicyclohexylammonium salt with dissolved albumin and albumin Nanoparticles for studying hyperforin effects on 2D cultivation of keratinocytes in vitro, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*
- J. Füller, N. Beißner, A. B. Albero, **T. Kellner**, L. Lauterboeck, J. Liang, M. Böl, B. Glasmacher, S. Reichl, C.C. Müller-Goymann, Improved in vitro models for preclinical drug and formulation screening focusing on 2D and 3D skin and cornea constructs, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*
- 2014 H. Ehmann, **T. Kellner**, O. Werzer, Non-contact-mode AFM induced versus spontaneous formed phenytoin crystals: the effect of layer thickness, *CrystEngComm*
- T. Kellner**, H. Ehmann, S. Schrank, B. Kunert, A. Zimmer, E. Roblegg, O. Werzer, The crystallographic textures and morphologies of solution cast ibuprofen composite films at solid surfaces (paper), *ACS Mol. Pharm.*